

UNIVERSIDAD DEL MAR

CAMPUS PUERTO ESCONDIDO



**IDENTIFICACIÓN DE PAPILOMAVIRUS CANINO EN EL TUMOR
VENÉREO TRANSMISIBLE MEDIANTE LA TÉCNICA DE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN CANINOS
(*Canis lupus familiaris*)**

T E S I S

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN PRODUCCIÓN Y SANIDAD ANIMAL

P R E S E N T A

SERGIO AYALA DÍAZ

DIRECTOR

Dr. JAIME ARROYO LEDEZMA

CO-DIRECTOR

Dr. JOAQUÍN MANZO MERINO

Puerto Escondido, Oaxaca 2017



UNIVERSIDAD DEL MAR

Puerto Escondido ~ Puerto Ángel ~ Huatulco

O A X A C A

Puerto Escondido, Oaxaca a febrero de 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

Después de realizar una revisión detallada de la tesis titulada **IDENTIFICACIÓN DE PAPILOMAVIRUS CANINO EN EL TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN CANINOS (*Canis lupus familiaris*)**, presentada por el alumno egresado de la Maestría en Producción y Sanidad Animal, Sergio Ayala Díaz, se considera que cumple con los requisitos y calidad para ser defendida en el examen profesional.

COMISIÓN REVISORA

Dr. Jaime Arroyo Ledezma
Universidad del Mar
Director

Dr. Joaquin Manzo Merino
Instituto Nacional de Cancerología
Co-director

Dr. Enrique Aburto
University of Prince Edward Island
Revisor

E Aburto.

Dr. Noé Ruíz García
Universidad del Mar
Revisor.

Dra. Mónica Marcela Galicia Jiménez
Universidad del Mar
Revisor

DEDICATORIA

A mis padres, Teresa Díaz y Andrés Ayala, por estar a mi lado y motivarme a seguir siempre adelante. A mis hermanos y sobrinos que hacen de mi vida una aventura llena de felicidad y a Dan por todo el apoyo, consejos, motivación y sobre todo por estar siempre a mi lado.

Por encima de todo... no le temas a los momentos difíciles, el mejor viene de ellos. Mantén tu cerebro ilusionado, activo, hazlo funcionar y nunca se degenerará
(Rita Levi Montalcini, Premio Nobel de Medicina).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Mar, campus Puerto Escondido (UMAR).

Al departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de México (FMVZ – UNAM).

Al Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos del Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

Gracias por las facilidades para llevar a buen término el presente proyecto.

Un agradecimiento especial a los doctores Jaime Arroyo, Joaquín Manzo y Enrique Aburto, por su dirección y enseñanza en este proyecto y a la Dra. Marcela Lizano por el apoyo brindado en el Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos.

A mis compañeros, amigos, compadres y colegas Aldo y Ulises, la maestría fue sin duda una experiencia inigualable.

A la MC Alejandra Buenrostro, MC Jesús García y MC Mabel de la Torre, mil gracias por sus consejos académicos y personales.

A todos los que participaron y que estuvieron conmigo a lo largo de este camino, les estoy totalmente agradecido.

ÍNDICE DE CONTENIDO	PÁGINAS
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
Antecedentes	7
Tumor Venéreo Transmisible.....	9
Patogénesis	10
Diagnóstico	11
Tratamiento.....	11
Papilomavirus	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Población de estudio.....	15
Toma de muestras	15
Hemograma	16
Bioquímica clínica básica.....	16
Glucosa.....	16
Urea	16
Creatinina	16
Ácido Úrico	17
Colesterol.....	17
Triglicéridos	17
Análisis citológico.....	17
Análisis histopatológico.....	17
Análisis molecular	18
Extracción y purificación de DNA.....	18

Electroforesis del DNA extraído de las biopsias	19
Selección de iniciadores	19
Amplificación por PCR del DNA de las biopsias	20
Electroforesis de los productos de PCR	21
Análisis genético	21
RESULTADOS	22
Población de estudio	22
Análisis macroscópico del Tumor Venéreo Transmisible	22
Hemograma	23
Bioquímica clínica	25
Análisis microbiológico	25
Análisis citológico	26
Análisis histopatológico	27
Análisis molecular	27
DISCUSIÓN	31
CONCLUSION	37
PERSPECTIVAS	37
REFERENCIAS	38
APÉNDICE	46
Abreviaturas	46
Secuencias de los productos positivos para Papilomavirus	47

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
FIGURA 1. ESQUEMATIZACIÓN CELULAR.	16
FIGURA 2. PACIENTE CANINO HEMBRA.	23
FIGURA 3. PACIENTE CANINO MACHO.	23
FIGURA 4. HEMOGRAMA DE LA PACIENTE AZUL.	24
FIGURA 5. PLACA DE REACCIÓN DE BIOQUÍMICA CLÍNICA.	25
FIGURA 6. CULTIVO MICROBIOLÓGICO.	25
FIGURA 7. FOTOMICROGRAFÍAS DE IMPRONTAS.	26
FIGURA 8. FOTOMICROGRAFÍAS DE IMPRONTAS.	26
FIGURA 9. CORTE HISTOLÓGICO DE BIOPSIAS.	27
FIGURA 10. PCR REALIZADA A PARTIR DE DNA GENÓMICO.	28
FIGURA 11. PCR REALIZADA A PARTIR DE DNA GENÓMICO.	28
FIGURA 12. PCR REALIZADA A PARTIR DE DNA GENÓMICO.	29
FIGURA 13. PCR REALIZADA A PARTIR DE DNA GENÓMICO.	29
FIGURA 14. PCR REALIZADA A PARTIR DE DNA GENÓMICO.	30

ÍNDICE DE CUADROS

PÁGINA

CUADRO 1. SECUENCIA DE INICIADORES PARA PAPILOMAVIRUS.....	19
CUADRO 2. SECUENCIA DE INICIADORES DE INTEGRIDAD GÉNICA	20
CUADRO 3. PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN PARA PCR.....	20
CUADRO 4. MEZCLA DE REACCIÓN (MASTER MIX).....	21

RESUMEN

El Tumor Venéreo Transmisible también conocido como sarcoma infeccioso, granuloma venéreo, linfosarcoma transmisible o Sarcoma de Sticker, es una enfermedad neoplásica que afecta principalmente a caninos y que se contagia durante el coito, principalmente. El Tumor Venéreo Transmisible se localiza principalmente en los genitales y con menor frecuencia en cavidad nasal, cavidad oral, ojo y piel. En el caso del macho la masa tumoral se encuentra en el bulbo del glande mientras que en la hembra en el vestíbulo de la vagina. A la fecha, se desconoce si el factor detonante es un agente viral. Debido a ello se realizó la presente investigación donde se analizaron 21 muestras de pacientes con Tumor Venéreo Transmisible a los cuales se les realizó una evaluación clínica, citológica, histopatológica, hemograma, bioquímica clínica, cultivo de lesión tumoral y análisis molecular. Se corroboró el diagnóstico clínico y se demostró la presencia de DNA viral en las muestras mediante la amplificación del gen L1 (Gen que codifica para la proteína mayor de la cápside de los papilomavirus) con los iniciadores universales MY09 y MY11, y se demostró la presencia de una banda de 450 pb en siete muestras de 21 (33 %). Las muestras positivas fueron secuenciadas a través del servicio de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) para obtener la secuencia completa del amplicón, de las siete muestras enviadas seis resultaron positivas a Papilomavirus. Por otra parte, los resultados de PCR obtenidos con los iniciadores PVF y FAP-64 mostraron una positividad en 16 de 21 muestras (76 %). Mientras que con la PCR para el gen E1 (CP4 y CP5) no se observó amplificación. De ahí que la detección de secuencias virales, sustenta la posible asociación entre el Papilomavirus canino (CPV) y el Tumor Venéreo Transmisible; sin embargo, se hacen necesarios mayores estudios para demostrar la etiología de esta enfermedad. Este estudio representa un precedente importante en el entendimiento y estudio del agente causal del tumor.

Palabras clave: Tumor venéreo transmisible, Papilomavirus canino, virus, PCR.

ABSTRACT

The Venereal transmissible tumor (TVT), also known as infectious sarcoma, venereal granuloma, transmissible lymphosarcoma or Sticker's sarcoma, is a neoplastic disease affecting dogs and its propagated mainly during the intercourse. The TVT is located mainly in the genital area with a lower frequency at the oral cavity, nasal cavity, eyes and skin. The disease is presented as a tumoral mass at the glans bulb in males, and in the vaginal vestibule. Up to date, there is no evidence for a viral agent as the causative agent for TVT development. The present work was aimed to analyze 21 samples from canines with TVT for clinical, cytological and histopathological evaluation, as well as for blood count, clinical chemistry, bacterial culture and molecular analysis to identify papilloma virus DNA sequences. Clinical diagnostic confirmed the clinical and biochemical features for TVT and molecular analysis demonstrated the viral DNA presence in the samples through the amplification of the viral sequence L1 (major capsid coding gene of papilloma virus) using different primer sets, the MY primers amplified a 450 bp band in seven out of 23 samples (33%). L1 positive samples were sequenced to analyze the identity of the PCR product. The PVF and Fap-64 primer set, targeting the L1 sequence of Canine Papilloma Virus (CPV), showed positivity in 16 out of 21 samples (76%). On the other hand, the amplification using the CP4/5 primer set, aimed to amplify the E1 region of CPV, showed no amplification at all. These results support the possible causative association between CPV and TVT; nevertheless, confirmatory studies are required to confirm such as statement. This work represents the first evidence indicating that a viral agent might be involved in the pathogenesis of TVT with high impact in the understanding of TVT pathogenesis.

Key words: Transmissible venereal tumor, Canine papillomavirus, virus, PCR.

INTRODUCCIÓN

La larga convivencia histórica entre los perros y el hombre ha tenido como consecuencia la selección genética de los mismos, la cual se remonta a finales del siglo XIX, dando lugar a más de 30 generaciones de cría selectiva (Sierra *et al.* 2011). A partir de su domesticación, los caninos adquirieron un papel relevante en la vida del hombre, han sido empleados para diversas actividades entre las que destacan: agentes de guerra, cacería en sus diferentes modalidades, guía de personas invidentes, detección de drogas, con fines terapéuticos y principalmente como animales de compañía (Cruz-Reyes 2009, Sierra *et al.* 2011).

Sin embargo, esta relación estrecha no ha sido siempre exitosa, la complejidad y la variabilidad de la sociedad humana, provoca en ocasiones maltrato, crueldad y abandono, generando que algunos perros queden expuestos a diversos factores ambientales y socioculturales propios del hombre, generando que entren en situación de calle; no obstante, éstos siguen manteniendo una estrecha relación con el hombre y, de alguna manera, aún dependen de ellos para alimentarse de sobras de comida en la basura o por alimentación directa o circunstancial estando en contacto directo con los perros con dueño (Bentosela & Mustaca 2007).

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que uno de los mayores problemas en las urbes, generados por la presencia de perros en situación de calle, es la contaminación generada por sus heces, las cuáles facilitan la transmisión de enfermedades zoonóticas (*Toxocara* spp., *Dipylidium caninum*, *Salmonella* spp., etc.), siendo un problema de magnitud considerable en cualquier parte del mundo, incluso en países desarrollados (Martínez-Barbabosa *et al.* 2008, Flores 2010).

Hay que mencionar además, que el problema no solo se limita a consecuencias en la salud del hombre, sino que los perros en sí son presa fácil de patologías infecto-contagiosas como las parasitarias, enfermedades bacterianas y virales y neoplásicas (Flores 2010). Dentro de estas, las neoplasias juegan un papel

importante en la comunidad canina; desde su inicio, la neoplasia provoca una variedad de signos, los cuales son cambiantes y complejos según avanza la enfermedad, los perros en fases avanzadas y terminales, son enfermos con múltiples afecciones, que en caso de ser perros sin hogar, llegan a morir en las calles o basureros (Redondo *et al.* 1998).

Los tumores más comunes de vulva y vagina en perras en etapa reproductiva son el leiomioma, fibroma, lipoma y el Tumor Venéreo Transmisible (TVT), para este último su frecuencia se reporta entre un 16 hasta el 34 por ciento en la ciudad de Mérida, Yucatán, México (Ortega-Pacheco *et al.* 2003). Las neoplasias vulvovaginales pueden ser extraluminales e intraluminales; si son benignas tienden a ser pedunculadas y a menudo se observan protruyendo de los labios vulvares. La visualización de estos tumores es posible cuando el animal hace fuerza a causa de la irritación en el momento de la micción y la defecación, en particular en los machos es posible observar un aumento de tamaño del pene mientras permanece en el prepucio o la observación directa de la masa tumoral cuando desenvaina el pene para la copula. Algunos autores han notado la influencia hormonal sobre la aparición tumoral y recidiva posquirúrgica en particular con los tipos tumorales benignos (Bojrab 1996).

El Tumor Venéreo Transmisible es una patología inusual en varios aspectos; primero porque las células del tumor son genéticamente distintas a las del perro, ya que contienen 59 cromosomas en lugar de 78 naturalmente presentes en las células somáticas del perro (Ramírez *et al.* 2010); y segundo, porque es transmitido durante el coito y tiene una distribución errática en todo el mundo, ocurriendo con mayor frecuencia en las áreas tropicales o subtropicales, donde los perros en situación de calle tienen una participación importante en la diseminación, aunque también se presenta con cierta frecuencia en mascotas de raza pura, por descuido en la tenencia y desconocimiento a la hora del apareamiento de los mismos (Ortega-Pacheco *et al.* 2003, Calero *et al.* 2006).

El TVT es un tumor que afecta principalmente al aparato reproductor, con mayor frecuencia en su porción externa y ocasionalmente a los genitales internos. Así mismo, hay formas de presentación extra-genital las cuales incluyen: cavidad oral, fosas nasales, ojos y piel (Calero *et al.* 2006, Kemal *et al.* 2012).

El crecimiento del TVT comienza entre 15 y 60 días después de la implantación, la masa tumoral puede crecer en forma lenta e impredecible durante años o ser invasivos y eventualmente transformarse en malignos y producir metástasis (López & Gutiérrez 2014). Las masas tumorales inicialmente se presentan pequeñas, rosadas a rojas, superficiales y pedunculadas. Luego, estos nódulos múltiples se unen formando masas más grandes, rojas, hemorrágicas y frágiles, que infiltra la mucosa y forman lesiones multilobulares en la submucosa, con diámetros que pueden llegar a los 10 o hasta 15 cm. Los tumores sangran fácilmente y a medida que crecen pueden llegar a ulcerarse y a contaminarse con bacterias coliformes, principalmente (Ramírez *et al.* 2010).

A nivel microscópico se puede apreciar que el TVT está compuesto de células redondas indiferenciadas de origen mesenquimatoso, que contienen un citoplasma eosinofílico pálido y vacuolado y un núcleo redondo hiper cromático con uno o dos nucléolos evidentes y un número moderado de figuras mitóticas y la relación núcleo citoplasma es grande (Ramírez *et al.* 2010). Cabe señalar que a pesar de que se han publicado trabajos de inmunología, análisis cromosómicos y de inmunofenotipo, aún no se han logrado aclarar los mecanismos con que cuenta para evadir la respuesta inmune y en el caso de la presentación espontánea, como es que el sistema inmunológico actúa sobre él para conseguir su regresión (González *et al.* 2002, Siddle & Kaufman 2014).

Avanzando en el razonamiento carcinogénico, es bien sabido que la capacidad oncogénica de algunas familias de virus no es un tema ajeno a la medicina veterinaria. Sin embargo, se desconoce si el factor detonante o estimulante del Tumor Venéreo Transmisible es un agente viral y que mecanismos

están implicados en sus diferentes presentaciones (Dejuq & Bernard 2001). Hay que mencionar, además que los virus con potencial oncogénico reportados en la literatura son los pertenecientes a las familias Herpesviridae, Poxviridae, Adenoviridae y Papillomaviridae, entre otros.

Los miembros de la familia Herpesviridae infectan al humano y a una amplia variedad de hospederos animales. Son de gran tamaño y se caracterizan por su habilidad de causar infecciones latentes. Hay divergencias con respecto a la secuencia del genoma, proteínas y propiedades biológicas, pero son similares en cuanto a la estructura general del virión y organización del genoma (Carter *et al.*2006). En cuanto a la familia Poxviridae, los viriones poseen un genoma de DNA de doble cadena (dsDNA) y son los más grandes y complejos de los virus animales conocidos. Infectan muchas especies de vertebrados e insectos. Algunos poxvirus son tan grandes que pueden ser vistos con microscopio óptico (Carter *et al.*2006). La familia Adenoviridae consiste en virus de DNA de doble cadena con nucleocápside icosaédrica. Se han aislado de muchas especies aviares y de mamíferos. Muchos se encuentran en el tracto respiratorio y con frecuencia las infecciones son persistentes. Sólo un pequeño número de ellos causan enfermedades de importancia veterinaria (Carter *et al.*2006).

En particular en la familia Papillomaviridae se encuentran una gran cantidad de papilomavirus (PVs) que causan papilomas (verrugas) de la piel y las membranas mucosas de la mayoría de los animales domésticos y una amplia variedad de otros mamíferos y aves, incluyendo al hombre (Rector & Van Rants 2013).

El Virus del Papiloma (VP) es un virus ubicuo: se han detectado más de 200 genotipos de VP, agrupados en géneros y especies, que pueden infectar a la mayoría de mamíferos, pero también a las aves y los reptiles de los cuales aproximadamente 14 tipos de Papilomavirus Canino han sido identificados. Tienen un tropismo por los queratinocitos de la piel y las células epiteliales de las mucosas. Cada genotipo tiene una gran especificidad de huésped, pero también de

localización anatómica y, en cierta medida, de tipo lesional (de Alcántara *et al.* 2014, Fouéré *et al.* 2016).

Los PVs son virus no envueltos que con mayor frecuencia se han asociado a proliferaciones benignas epiteliales de mucosas y piel. Así mismo, el grupo denominado de alto riesgo se ha asociado al desarrollo del cáncer en humanos, este grupo viral tiene la capacidad de infectar a las células epiteliales de vertebrados, donde pueden permanecer asintomáticos y en ciertas condiciones provocar neoplasias. Estos virus poseen un genoma de DNA circular bicatenario de aproximadamente 8 000 pb que codifica para ocho o nueve marcos abiertos de lectura, los cuales son transcritos como mRNA policistrónico (Luff *et al.* 2012).

La cápside del virus está formada por las proteínas L1 y L2 La proteína L1 es el elemento estructural primario, encontrándose 360 copias de la proteína organizada en 72 capsómeros en los viriones infectantes. La proteína L2 interviene en la entrada del virus a la célula, en la localización de los componentes virales en el núcleo, la unión al DNA, en la formación de la cápside y en la estabilidad de la partícula viral. Ambas proteínas juegan un papel importante mediando la eficiencia de la infectividad del virus (Lelo *et al.* 2012).

La transmisión del virus se da cuando las partículas virales infectan las células basales del epitelio a las cuales acceden mediante micro-heridas o abrasiones en los epitelios, una vez que ha infectado la célula, el virus emplea la maquinaria de replicación celular para iniciar la replicación del DNA viral. De este modo la infección producida por los Papilomavirus ocurre una vez que el virus se adhiere a una célula epitelial escamosa a partir de lo cual pueden ocurrir dos tipos de infección: productiva o latente (De la Fuente-Villarreal *et al.* 2010).

En las infecciones productivas o activas, la replicación viral se lleva a cabo principalmente en células escamosas ya diferenciadas, esto es, en las capas interna y superficial del epitelio escamoso cutáneo y mucoso, en donde ocurre una intensa

actividad de replicación del ADN viral, con producción de proteínas de la cápside y ensamblaje de nuevos viriones, los cuales producen cambios celulares característicos en las células infectadas. En un estudio citológico el efecto citopático observado incluye acantosis, vacuolización citoplásmica prominente, atipia nuclear y binucleación (De la Fuente-Villarreal *et al.* 2010).

En la infección de tipo latente, la infección ocurre predominantemente en células inmaduras (células basales o células metaplásicas) del epitelio escamoso y el DNA viral permanece dentro de la célula en forma circular libre (forma episomal) sin replicarse. No hay cambios morfológicos identificables en la citología, por lo que la detección viral en este tipo de infecciones solo puede hacerse mediante métodos moleculares (De la Fuente-Villarreal *et al.* 2010).

Los papilomavirus han sido relacionados con diferentes entidades neoplásicas en medicina veterinaria, como es el caso del Carcinoma de Células Escamosas en equinos, el cual se caracteriza por la presentación de lesiones papilomatosas benignas presentes en el pene equino y es considerado como una proliferación pre-maligna potencial (Carbajal *et al.* 2012). Así mismo la papilomatosis bovina es una enfermedad del ganado vacuno la cual muestra la presencia de papilomas y fibropapilomas, especialmente en piel y ubre. Está originada por la infección por Papilomavirus Bovino (BPV), aunque originalmente se describieron en ganado vacuno, algunos genotipos (BPV-1 y BPV-2) se han asociado al desarrollo de papilomas en búfalos, cebras, jirafas y yaks y otros genotipos se han relacionado con el desarrollo de tumores en tracto gastrointestinal y cáncer de vejiga urinaria en ganado bovino (Vázquez *et al.* 2012).

En perros se han identificado algunos tipos virales tales como el Papilomavirus Canino (CPV1) que induce papilomas en membranas mucosas de cavidad oral y en piel; las lesiones papilomatosas pueden progresar a carcinoma de células escamosas. El CPV2, CPV6 y CPV7 han sido aislados a lesiones papilomatosas en caninos, mientras que los CPV3, CPV4, CPV5, CPV8, CPV9, CPV10, CPV11 y

CPV14 están asociados con el desarrollo de placas pigmentadas. Además se ha identificado al CPV13 en papilomas orales, mientras que el papel del CPV12 como patógeno aún no ha sido del todo aclarado (de Alcántara *et al.* 2014).

Si bien los Papilomavirus tienen un alto tropismo por las células epiteliales también tienen la capacidad de infectar otros tipos de células, siempre y cuando estas cuenten con los receptores celulares que necesita el virus para llevar a cabo el proceso de infección. Con respecto a las células del TVT la inmunohistoquímica demuestra inmunoreactividad fuerte a Vimentina, CD45 y CD45RA, lo que sugiere un origen leucocitario con expresión positiva para Lisozima y alfa-1-antitripsina lo que sugiere un origen histiocítico (Gross *et al.* 2005, Mi-Sun *et al.* 2006).

El tumor venéreo transmisible canino ha sido objeto de diversos estudios a lo largo del tiempo, sin embargo hay mucho que aún se desconoce sobre su biología. Lo dicho hasta aquí supone que cada una de estas entidades vinculadas a factores de riesgo distintos (tales como predisposición genética, ambientales, nutricionales, etc.) y, evidentemente, con sintomatología diversa, tienen la capacidad de producir inestabilidad génica, generando la aparición de lesiones que pueden transformarse en futuras neoplasias. De aquí surge una pregunta importante ¿cuál es el rol que juega la presencia del PVC en la biología del tumor venéreo transmisible?

REVISIÓN DE LITERATURA

Antecedentes

La existencia del cáncer se conoce desde la antigüedad, en los viejos manuscritos de Egipto y de la India ya se hablaba de tumores ulcerados. Incluso se han encontrado momias de las dinastías de los Gizeh (quinta dinastía, Egipto) con tumores óseos. Así mismo, Hipócrates conocía el cáncer, al que denominó karkinos (carcinoma), y separó los cánceres duros de los ulcerados e incluso describió diferentes variedades de tumores malignos como los de útero, mama y estómago entre otros. De igual manera, señaló la importancia de un tratamiento precoz en el pronóstico del cáncer (García-Conde & Díaz-Rubio 2000).

Como ya se ha mencionado el cáncer es una enfermedad cuya existencia es conocida, pero ha comenzado a tener importancia a lo largo del siglo XX por la magnitud de las cifras de mortalidad que ocasiona día con día (Senra 2002, De la Cruz *et al.* 2015).

El cáncer es una enfermedad multifactorial, de etiología discutida, donde la edad, el sexo, la raza y la herencia se reconocen como factores determinantes de riesgo, según las distintas localizaciones. Así mismo, la dieta, la exposición a agentes tóxicos, el estilo de vida y el medio en general, incluyendo la infección por microorganismos, son factores que actúan sobre las células como iniciadores o promotores tumorales (Díaz *et al.* 1998,).

Aunado a ello, el cáncer es caracterizado por: una proliferación incontrolada, resistencia a la muerte celular, resistencia a la señalización de supresión del crecimiento, promoción de la angiogénesis y la invasión o metástasis. Por ello se puede decir que el cáncer es consecuencia de una combinación de alteraciones proteicas, mutaciones, reordenamientos cromosómicos y cambios epigenéticos que repercuten en la regulación de procesos celulares implicados en la homeostasis (Webster 2015). Recientes avances en biología molecular han permitido la caracterización de genomas completos de algunos tipos de cáncer y se han identificado aproximadamente de 33 a 66 mutaciones somáticas en tumores humanos comunes como el de mama, colon y cáncer de páncreas (Vogelstein *et al.* 2013).

Los avances en biotecnología también han permitido la obtención de una extensa cantidad de información genómica, transcriptómica, metabolómica y proteómica de tumores dentro de sus microambientes. La disección de las redes de citocinas y quimiocinas ha proporcionado nuevas pistas para las interacciones entre las células cancerosas y su entorno (Raposo *et al.* 2015).

Dentro de los agentes biológicos implicados en la génesis del cáncer encontramos varios ejemplos bien definidos (*Helicobacter pylori*, HPV, Epstein Barr, etc.) que han sido asociados molecular y epidemiológicamente al desarrollo de la

enfermedad, si bien las infecciones por estos agentes suelen pasar desapercibidas y en la mayoría de los casos son eliminadas por el hospedero, una cierta proporción de los mismos evoluciona a cáncer, bajo ciertas circunstancias, categorizando a estos agentes biológicos como causa necesaria, más no suficiente para el desarrollo de la carcinogénesis, influyendo en los pasos iniciales y el establecimiento de la enfermedad, es por ello que la presencia de un microorganismo en el Tumor Venéreo Transmisible podría estar asociado, directa y proporcionalmente, al desarrollo de esta enfermedad (Cervera 2005, Ferrís *et al.* 2004, Kennedy *et al.* 1977).

En países como Estados Unidos el aumento en los casos de cáncer en perros se ha convertido en una preocupación en salud animal, ya que se ha convertido en una de las principales causas de muerte en la población canina y se estima que uno de cada cuatro perros morirán de cáncer en los próximos años (Fan 2014).

Tumor Venéreo Transmisible

El Tumor Venéreo Transmisible tiene una distribución en todo el mundo. Se considera una entidad endémica en Puerto Rico, mientras que en las islas británicas no se le ha reconocido (Ramírez *et al.* 2010). En Estados Unidos de América existen ambas distribuciones, es decir, hay áreas en las cuales el Tumor Venéreo Transmisible se observa con frecuencia mientras que en otros sitios se registran muy pocos casos, fenómeno que también se observa en Europa, Asia y África. En España se observa raramente, mientras que en México, es considerado endémico (Ramírez *et al.* 2010).

En un análisis retrospectivo de frecuencias realizado por De Buen *et al.* (1988) en México, encontraron que el Tumor Venéreo Transmisible ocupó el primer lugar de las neoplasias benignas en perros en el periodo de 1984 a 1985, con 45 casos (21.63 %) de 208 casos; y en 1986 con 19 casos (16%) de 112 casos. Así mismo, un estudio descriptivo retrospectivo realizado en la sección de Clínica Quirúrgica del Hospital Veterinario de la Universidad de Caldas, Colombia, por Franco & Silva-Lolano (2009) demostró la presencia del Tumor Venéreo Transmisible entre las principales patologías de aparato reproductor canino,

ocupando 7.3 % con respecto a otras afecciones como piometra (24.7 %), partos distócicos (9.3 %) y enfermedad prostática (3.6 %).

Patogénesis

El Tumor Venéreo Transmisible se propaga y se mantiene en la población de perros a través del coito, por lameduras o mordeduras (Morales & González 1995). Novinsky demostró en 1876 que las células del Tumor Venéreo Transmisible tomadas de un paciente con dicha neoplasia, trasplantadas a un paciente sano, podían ocasionar la aparición de sarcomas en estos individuos, después del día catorce de la inoculación, con lo cual se establece la sospecha de un factor biológico como el agente causal. Sin embargo, cuando se realizó el mismo procedimiento utilizando extractos libres de células no se desarrolló el tumor. Estas vertientes han generado la polémica sobre la génesis de la neoplasia (Kennedy *et al.* 1977).

El Tumor Venéreo Transmisible se desarrolla normalmente en la mucosa del tracto reproductor de la hembra (generalmente en vulva y vestíbulo vaginal) y en el pene en el caso de los machos. Sin embargo, se ha diagnosticado en zonas extra genitales como piel, sistema respiratorio superior, cavidad bucal y contornos de los ojos. Así como en bazo, hígado, cerebro y pulmones (Ortega-Pacheco *et al.* 2003).

En perros de experimentación, este tumor es de naturaleza benigna y en muchas ocasiones regresa de forma espontánea. Sin embargo, en los casos de presentación natural son frecuentes las metástasis y se desconoce la existencia de remisiones espontáneas, por lo que se indica tratamiento quimioterapéutico en todos los casos (Benavides-Melo *et al.* 2012).

En estudios realizados por Kennedy *et al.* (1977) en perros portadores del tumor de Sticker se observaron partículas similares a virus mediante microscopia electrónica de transmisión, lo que deja un abanico de posibilidades sobre un agente viral involucrado en dicha neoplasia.

Los papilomavirus son agentes ampliamente distribuidos en la naturaleza e infectan diversas especies de aves, mamíferos y reptiles, así mismo tienen tropismo por los epitelios, infectando predominantemente la piel y las membranas mucosas

produciendo proliferaciones epiteliales benignas o papilomas que, bajo ciertas circunstancias, pueden experimentar una transformación maligna (Rautava & Syrjanen 2012, Rector & Van Ranst 2013).

Diagnóstico

A la exploración física los signos clínicos del sarcoma de Sicker se evidencian de acuerdo a la localización de la masa tumoral, cuando la neoplasia se encuentra en vagina o en el pene, a medida que ésta va creciendo se puede observar que protruye de entre los labios de la vulva o en el caso del macho se observa la aparición de fimosis. Posteriormente, se pueden apreciar ligeras descargas de material hemorrágico, lo cual, al inicio de la neoplasia se puede llegar a confundir con una uretritis, cistitis o prostatitis. En casos de una localización extragenital los signos que se presentan van de acuerdo al órgano o mucosa donde está localizado (González *et al.* 1997, Ramírez *et al.* 2010).

El diagnóstico definitivo está basado en la exploración física y los hallazgos en la citología o histopatología compatibles con Tumor Venéreo Transmisible (González *et al.* 1997).

Tratamiento

La quimioterapia citotóxica convencional ha sido el pilar de la terapia contra el cáncer sistémico durante más de 50 años. La quimioterapia como tratamiento del cáncer en las mascotas inició a principios de 1970, apenas 25 años después del nacimiento de la oncología médica humana (Klahn 2014). Tanto para los pacientes humanos y veterinarios, la mayoría de los protocolos implican la administración de agentes antiproliferativos simples o múltiples administrados a dosis cercanas a la dosis máxima tolerada (DMT). Dado que las células neoplásicas se están dividiendo rápidamente en comparación con los tejidos normales, la quimioterapia DMT está destinada a matar la mayor parte de la población de células neoplásicas como sea posible. Un aspecto crítico de todos los protocolos de DMT es la inclusión de los descansos entre las administraciones de fármacos para permitir la recuperación de los tejidos normales sensibles a estos fármacos, en particular los progenitores de médula ósea y las células epiteliales gastrointestinales. Sin estos periodos de

recuperación entre tratamientos, se produce toxicidad inaceptable de los medicamentos. Sin embargo, este enfoque también permite la recuperación de las células tumorales y puede conducir a un nuevo crecimiento del tumor y el desarrollo de enfermedades resistentes a los medicamentos o metástasis (Biller 2014).

En específico para el Tumor Venéreo Transmisible han usado varias alternativas terapéuticas en los cuales los tratamientos más eficaces son la quimioterapia y la radioterapia; no obstante, en algunos casos se sigue usando el tratamiento quirúrgico. Con respecto al tratamiento quirúrgico, la extirpación de la masa tumoral es un procedimiento poco común ya que se producen muchas recidivas post-tratamiento (Calero *et al.* 2006).

La extirpación quirúrgica de tumores primarios puede ayudar en el tratamiento del cáncer pero conlleva el riesgo de desencadenar la proliferación de micrometástasis latentes. Muchos estudios experimentales y clínicos han demostrado que los mecanismos anti-angiogénicos y la vigilancia inmune son esenciales para inhibir las células tumorales metastásicas. Debido a que el estrés quirúrgico a menudo induce una reducción de factores antiangiogénicos en paralelo con el aumento de factores angiogénicos y la supresión de la vigilancia inmunológica durante el período post-operatorio, se requiere la aplicación de nuevas estrategias de inmunoestimulación y quimioterapia durante el periodo perioperatorio (Kadosawa & Watabe 2015).

La cirugía es el pilar principal en el diagnóstico y el tratamiento de la mayoría de los tumores sólidos en animales pequeños. Se puede utilizar como terapia única en algunas situaciones, pero a menudo se utiliza en conjunto con terapias adyuvantes tales como la quimioterapia y la radiación. Los métodos de biopsia para el diagnóstico y la estadificación tienen un impacto considerable en la evolución del paciente (Boston & Henderson 2014).

En particular, en el tratamiento quimioterapéutico, el medicamento que mejores resultados ha mostrado es el sulfato de Vincristina, el cual interfiere en el montaje de los microtúbulos mediante su combinación con la tubulina; este efecto

altera diversos procesos celulares, como la formación de husos y la mitosis, así como la inhibición de la síntesis de RNA y proteínas (Remington 2003). Cabe mencionar que la mayoría de los agentes citotóxicos actuales aprobados para el tratamiento del cáncer están asociados con efectos secundarios graves en seres humanos y animales. Estos medicamentos normalmente se dirigen a las células neoplásicas a través de diferentes mecanismos moleculares, sin embargo no son exclusivos de las células cancerígenas, pues también afectan a las células normales en otros tejidos, tales como la médula ósea, intestino o los tejidos linfoides (Hooker & Blomme 2015).

Papilomavirus

Los papilomavirus se caracterizan por ser pequeños virus no envueltos que miden entre 45 nm a 55 nm de diámetro, con una cápside icosaédrica de proteínas. Poseen un genoma de ácido desoxirribonucleico (DNA) circular de doble cadena, de aproximadamente 8 000 pares de bases de longitud, contiene ocho regiones codificantes, denominadas marcos abiertos de lectura (ORFs por sus siglas en inglés) (De La Fuente-Villareal *et al.* 2010). El genoma viral puede ser dividido en tres regiones: la región temprana E (Early) la cual representa el 45% del genoma y está constituida por los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7, vinculados con la replicación y patogenicidad; la región tardía L (Late) que comprende alrededor del 40% del genoma viral e incluye los genes L1 y L2, de los cuales L1 está altamente conservado en los Virus del Papiloma de distintas especies y codifica para la proteína principal de la cápside, y L2 codifica para la proteína menor de la cápside; y la región larga de control LCR (Long control región), también denominada región reguladora URR (Upstream Regulatory Region), representa el 15% del genoma viral, no codifica proteínas y está relacionada con la regulación de la transcripción, la virulencia y el potencial oncogénico (Correa & Picconi 2009, Rautava & Syrjanen 2012).

HIPÓTESIS

El Papilomavirus Canino está asociado con la enfermedad neoplásica de transmisión sexual en caninos (*Canis lupus familiaris*) conocida como Tumor Venéreo Transmisible.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la presencia de Papilomavirus Canino en biopsias del Tumor Venéreo Transmisible mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en caninos (*Canis lupus familiaris*) de Puerto Escondido, Oaxaca.

Objetivos específicos

1. Evaluar los cambios morfológicos de las células del Tumor Venéreo Transmisible en improntas de masas tumorales.
2. Evaluar las alteraciones histopatológicas en biopsias de caninos con Tumor Venéreo Transmisible.
3. Identificar la presencia de infecciones concomitantes en las masas tumorales mediante técnicas de microbiología convencionales.
4. Evaluar el estado anímico de los pacientes por medio de un hemograma completo.
5. Medir el estado metabólico de los pacientes mediante una bioquímica básica.
6. Estandarizar condiciones de PCR para Papilomavirus.
7. Estandarizar condiciones de PCR para Papilomavirus canino.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la ciudad de Puerto Escondido, Oaxaca, México. En dicha región geográfica el clima es predominantemente cálido húmedo con dos estaciones bien diferenciadas, secas y lluvias (Awo y Awl), con una precipitación media anual entre 839.1 y 1587.1 mm y una temperatura que va de los 24 a los 27.2 °C (Serrano-Altamirano *et al.* 2005).

El procesamiento de las muestras se realizó en los laboratorios de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), México, D.F. y en el Laboratorio de Reproducción de la Universidad del Mar (LR-UMAR), Puerto Escondido, Oax.

Población de estudio

El grupo de estudio estuvo constituido por 21 pacientes con diagnóstico clínico de Tumor Venéreo Transmisible, en el servicio de oncología de Esteriliza y Educa A. C. durante el período comprendido entre enero y octubre de 2014.

Toma de muestras

A los pacientes seleccionados se les realizó un hemograma y bioquímica clínica básica, tomando la muestra de sangre de la vena cefálica con el método Vacutainer (Vacutainer®, Becton Dickinson, New Jersey, USA).

De igual modo a dichos pacientes, se les tomó una muestra clínica, con un hisopo estéril, de la superficie de la masa tumoral y se sembró en los medios de cultivo Mac Conkey, Gelosa Sangre y Sabouraud. Así mismo, se realizó un frotis y se tiñó según la técnica de Gram (Madigan *et al.* 2014).

Seguido de ello, se tomaron biopsias incisionales, las cuales se fragmentaron en dos partes, una para el estudio histopatológico de la masa tumoral y una para el estudio molecular, ésta última fue preservada en solución salina fisiológica a -20° C hasta su análisis. Simultáneamente, con la masa tumoral extraída se realizaron dos improntas las cuales se tiñeron por la técnica de Wright y Papanicolaou (Matz 2015).

Hemograma

Para el hemograma de los pacientes en estudio se realizó la técnica de impedancia con el equipo Cell Dyn 1800 (Marca “ABBOTT”, fabricación U.S.A.) del laboratorio particular Diagnóstico Veterinario Especializado. Al mismo tiempo se realizó un frotis de sangre periférica y se tiñó con la técnica de Wright (Cowell & Valenciano 2014, Campbell 2015), para hacer el análisis diferencial de leucocitos y el análisis morfológico de las células sanguíneas (Figura 1).

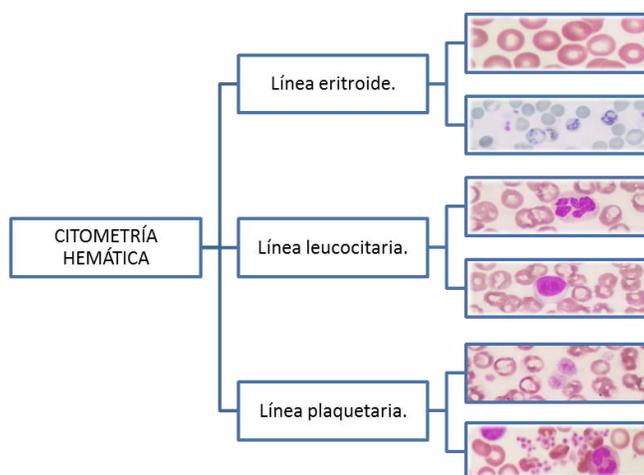


Figura 1. Esquematización de la citometría hemática. La citometría hemática comprende el análisis de las líneas eritroide, leucocitaria y plaquetaria, en la cual se detectan diversas alteraciones asociadas a patologías.

Bioquímica clínica básica

Glucosa: la cuantificación se determinó usando la técnica de Glucosa oxidasa/Peroxidasa, donde la glucosa presente en la muestra origina un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría a 500 nm.

Urea: la cuantificación se determinó mediante la técnica de Ureasa/Salicilato donde la urea presente en la muestra origina un indofenol coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente a 600 nm.

Creatinina: la cuantificación de la creatinina se determinó mediante la técnica de Picrato alcalino donde la creatinina presente en la muestra reacciona con el picrato en medio alcalino originando un complejo coloreado. Se mide la velocidad de

formación de dicho complejo en periodos iniciales cortos, evitándose así la interferencia de otros compuestos a 500 nm.

Ácido Úrico: la cuantificación se determinó mediante la técnica de Uricasa/Peroxidasa donde el ácido úrico presente en la muestra origina un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría a 520 nm.

Colesterol: la cuantificación se determinó mediante la técnica de Colesterol oxidasa/Peroxidasa donde tanto el colesterol libre como el esterificado presente en la muestra originan un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría a 500 nm.

Triglicéridos: la cuantificación se determinó mediante la técnica de Glicerol fosfato oxidasa/Peroxidasa donde los triglicéridos presentes en la muestra originan un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría a 500 nm

Todas las pruebas bioquímicas fueron realizadas en el equipo ChemWell® 2910 (Awareness technology, Inc. Fabricación U. S. A.).

Análisis citológico

Las improntas se tiñeron mediante la técnica de Papanicolaou y Wright para confirmar el diagnóstico clínico y dar continuidad con el estudio (Cowell & Valenciano 2014, Bonfanti *et al.* 2015).

Análisis histopatológico

Las muestras de tejidos se colocaron en contenedores estériles con formaldehído al 10% y un amortiguador a pH 7.2 para su procesamiento, según la técnica estándar; se realizaron cortes de tejido con un micrótopo a un espesor de 2 a 4 μm y se utilizó la técnica de Hematoxilina y Eosina (H&E) para teñir las muestras y su posterior visualización en un microscopio óptico, Primo Star (Carl Zeiss, USA) (Kamstock *et al.* 2011).

Análisis molecular

Extracción y purificación de DNA

La extracción del DNA a partir de biopsias se realizó utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue Kit de Quiagen (cat.69506), siguiendo las indicaciones del fabricante:

1. El tejido obtenido de la biopsia se digirió en 400–500 µl de buffer de lisis y 8-10 µl de proteinasa K en un termomixer a 55°C durante 16 horas en agitación constante.
2. En seguida se agregó un volumen igual de una preparación de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (400-500 µl), homogeneizando la muestra con ayuda de un vortex.
3. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min.
4. Terminada la centrifugación se recuperó la fase acuosa en un tubo ependorf nuevo.
5. Posteriormente se agregó un volumen igual (400-500 µl) de cloroformo-isoamilico, homogeneizando la muestra con ayuda de un vortex.
6. Se centrifugo a 13 000 rpm durante 10 min.
7. Enseguida se recuperó la fase acuosa en un tubo ependorf nuevo.
8. Se agregaron 2 volúmenes de Etanol absoluto (1 ml) frío y 1/10 volumen de acetato de amonio 7.5M (50 µl) frío. Mezclando manualmente.
9. Se incubó el tubo a -70° C durante una hora.
10. Posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 minutos.
11. Se desechó el sobrenadante y se agregó al pellet 250 µl de etanol al 70% para lavar, agitando suavemente.
12. A continuación se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet (muestra de DNA).
13. Una vez seco se re-suspendió en 20-40 µl de agua estéril inyectable según el tamaño del pelet.
14. Para finalizar se cuantificó en un espectrofotómetro a 260/280 nm, NanoDROPS 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Electroforesis del DNA extraído de las biopsias

Para verificar la integridad del DNA resultante se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% utilizando buffer TAE 1X como disolución de corrida, se cargaron 2 µl de DNA en cada pozo mezclados con 3 µl de disolución de carga, las condiciones de la electroforesis fueron: 45 minutos a 80 volts, finalmente el gel se visualizó en un fotodocumentador (MultiDoc-It™ Imaging System, Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, UK) utilizando Gel Red. Como colorante.

Selección de iniciadores

Para la identificación de Papilomavirus Canino en biopsias del Tumor Venéreo Transmisible se utilizaron iniciadores universales para la detección de Papilomavirus, que amplifican el gen L1 (MY09 y MY11) (Gravitt *et al.* 2000); así como iniciadores específicos de Papilomavirus canino, PVf y FAP64 para el gen L1 e iniciadores CP4 y CP5 para el gen E1 (Cuadro 1) (Lange *et al.* 2011). Así mismo, se emplearon iniciadores para el gen de la β-globina (GH20 y PC04) y la enzima Glicereraldehído-3-fosfato deshidrogenasa específica de caninos (dogGAPDHf y dogGAPDHr) como indicadores de integridad génica (Cuadro 2) de acuerdo a lo establecido por Luff *et al.* (2012). Las condiciones de amplificación se describen en el cuadro 3 para cada par de iniciadores.

Cuadro 1. Secuencia de iniciadores para Papilomavirus.

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Dirección	Producto
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	F	450 pb
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	R	
PVf	CTTCCTGAWCCTAAYMAKTTTGC	F	450 pb
FAP64	CCWATATCWVHCATNTCNCCATC	R	
CP4	ATGGTACARTGGGCATWTGA	F	500 pb
CP5	GAGGYTGCAACCAAAAMTGRCT	R	

Cuadro 2. Secuencia de iniciadores de integridad génica

Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Dirección	Producto
GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	F	268 pb
PC04	CAACTTCATCAACGTTCCACC	R	
dogGAPDHf	GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	F	585 bp
dogGAPDHR	GACCACCTGGTCCTCAGTGT	R	

Cuadro 3. Protocolos de amplificación para PCR por juego de iniciadores.

Iniciadores	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclos
MY09	94 °C 50 seg.	55 °C 50 seg.	72 °C 55 seg.	38 ciclos
MY11				
PVf	94 °C 1 min.	50°C 1 min.	72°C 1 min.	45 ciclos
FAP64				
CP4	94 °C 30 seg.	42 °C 30 seg.	72°C 30 seg.	40 ciclos
CP5				
GH20	94 °C 50 seg	55 °C 50 seg.	72 °C 55 seg.	38 ciclos
PC04				
dogGAPDHf	94°C 30 seg.	50°C 30 seg.	72°C 30 seg.	45 ciclos
dogGAPDHR				

Amplificación por PCR del DNA de las biopsias de los pacientes con diagnóstico de Tumor Venéreo Transmisible

Para la realización de esta técnica se colocó en un tubo para PCR la mezcla de reacción de acuerdo a las especificaciones en el cuadro 4. Así mismo, se utilizó el programa correspondiente a cada juego de iniciadores establecido en el cuadro 3. Se incluyó como testigo positivo DNA extraído de células HeLa (positivas para VPH18) y como testigo negativo agua inyectable estéril.

Cuadro 4. Mezcla de reacción (*Master mix*).

Reactivo	Concentracion		Volumen	
Buffer 10 x	-	-	4.8	μL
dNTP's	0.4	mM	4.8	μL
MgCl ₂	4.0	mM	3.84	μL
MY09	10	μM	0.48	μL
MY11	10	μM	0.48	μL
amplitaq gold	0.05	U/μL	0.31	μL
DNA	100	ng/μL	2.0	μL
H ₂ O	-	-	3.29	μL
Volumen final para cada reacción			20.0	μL

Electroforesis de los productos de PCR

Para observar los productos de cada amplificación se preparó un gel de agarosa con una concentración al 1.3 % disuelto en tampón de corrida TAE 1X a pH 8 y se colocó en una cámara de electroforesis con TAE 1X como disolución de corrida. Se cargaron 5 μl de cada reacción mezclados con 5 μl de amortiguador de carga, las condiciones de la electroforesis fueron: 45 minutos a 90 volts, finalmente la visualización de las bandas se realizó por medio de un fotodocumentador (MultiDoc-It™ Imaging System, Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, UK) utilizando Gel Red. Como colorante.

Análisis genético

Los productos positivos a la amplificación por PCR con los iniciadores MY09/MY11, fueron secuenciados utilizando el método de Sanger (Sanchez & Trejo 2006), en seguida se realizó la limpieza de las secuencias en el programa BioEdit para eliminar ambigüedades nucleotídicas. Posterior a ello se analizaron las secuencias en el programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center of Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se ejecutó el alineamiento de las secuencias por MUSCLE en el programa MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) para Windows. Hecho lo anterior se realizó la

búsqueda de secuencias del gen L1 del Papilomavirus canino reportados en el Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

RESULTADOS

Población de estudio

Se obtuvieron un total de 21 pacientes con diagnóstico clínico de Tumor Venéreo Transmisible, de los cuales 7 (33 %) fueron machos y 14 (67 %) hembras, al corroborar el diagnóstico clínico por citología e histopatología, se incluyeron los 21 pacientes en el estudio. Así mismo, en 100% de los pacientes se observó presencia de la neoplasia en aparato reproductor. Cabe mencionar, que todos los pacientes recibieron tratamiento quimioterapéutico con base en sulfato de vincristina, después de la toma de muestras para el estudio y se realizó un monitoreo durante 3 meses posteriores al último ciclo de quimioterapia, sin observarse recidiva en ninguno de los 21 pacientes.

Análisis macroscópico del Tumor Venéreo Transmisible

En los pacientes con diagnóstico clínico de Tumor Venéreo Transmisible se apreció tejido de nueva formación en el vestíbulo de la vagina, en caso de hembras y en el dorso del bulbo del pene, en el caso de los machos, el cual se presentaba de tamaño variable en los individuos, con coloraciones de rosadas a rojas, superficiales y en algunos casos pedunculadas, hemorrágicas, frágiles, proyectándose hacia la luz de la vagina y el prepucio de diámetros entre 10-15 cm. Cabe mencionar que en el 100% de los pacientes la presentación del tumor fue genital (figura 2 y 3).



Figura 2. Tumor Venéreo Transmisible en paciente canino hembra. Se observa la masa tumoral protruyendo de los labios de la vulva, la masa tumoral se observa ulcerada y hemorrágica.



Figura 3. Tumor Venéreo Transmisible en paciente canino macho, la masa tumor se encuentra recubriendo la totalidad del bulbo del pene e impidiendo que el paciente desenvaine correctamente.

Hemograma

En el hemograma los pacientes no mostraron alteraciones, ya que todos se encontraron dentro de los intervalos de referencia para la especie (Figura 4). Así mismo, no se apreciaron cambios citológicos en los frotis de sangre periférica.



Paciente: AZUL
 Raza: CRIOLLA
 Edad: 3 años Sexo: Hembra
 Fecha: 15 de febrero de 2014
 Expediente: DVE140059
 Referido por: Dr. Jaime Arroyo Ledezma

**INFORME DE CITOMETRÍA HEMÁTICA
CANINOS (PERRO: *Canis lupus familiaris*)**

Serie Roja		Rango normal	
Hemoglobina	13.2	13.0 a 19.0	g/dL
Hematócrito	38.3	37.0 a 54.0	%
Eritrocitos	5.5	5.4 a 8.5	$\times 10^6 / \mu\text{L}$
Volumen globular medio	69.64	67.0 a 74.0	fL
Hemoglobina Glob. Med.	24.0	22.0 a 27.0	pg
Conc. Media de Hb glob.	34.46	34.0 a 36.0	g/dL
Reticulocitos	22.0	< 60.0	$\times 10^3 / \mu\text{L}$
VSG	9.0	< 10.0	

Serie Plaquetaria		Rango normal	
Plaquetas	406.0	160.0 a 430.0	$\times 10^3 / \mu\text{L}$

Notas

Serie Blanca		Rango normal	
Leucocitos totales	8400.0	6000.0 a 17000.0	$/\mu\text{L}$
	% Absolutos	Rango normal	
Neutrófilos Totales	68.0 5712.0	3000.0 a 11800.0	$/\mu\text{L}$
Neutrófilos seg.	66.0 5544.0	3000.0 a 11500.0	$/\mu\text{L}$
Neutrófilos en ban.	2.0 168.0	0.0 a 300.0	$/\mu\text{L}$
Metamielocitos	0.0 0.0	0.0 a 0.0	$/\mu\text{L}$
Mielocitos	0.0 0.0	0.0 a 0.0	$/\mu\text{L}$
Promielocitos	0.0 0.0	0.0 a 0.0	$/\mu\text{L}$
Blastos	0.0 0.0	0.0 a 0.0	$/\mu\text{L}$
Eosinófilos	6.0 504.0	100.0 a 1250.0	$/\mu\text{L}$
Basófilos	1.0 84.0	0.0 a 100.0	$/\mu\text{L}$
Monocitos	2.0 168.0	150.0 a 1350.0	$/\mu\text{L}$
Linfocitos	23.0 1932.0	1000.0 a 4800.0	$/\mu\text{L}$
Otros	0.0 0.0	0.0 a 0.0	$/\mu\text{L}$
Eritroblastos	0.0 eritroblastos / 100 leucos	0.0	$/\mu\text{L}$

Descripción

Diagnóstico sugerido

Figura 4. Hemograma de la paciente Azul, con diagnóstico de Tumor Venéreo Transmisible.

Bioquímica clínica

En la bioquímica clínica no se observaron cambios patológicos aparentes, el 100% de los pacientes se encontraron dentro de los intervalos de referencia para la especie (Figura 5).

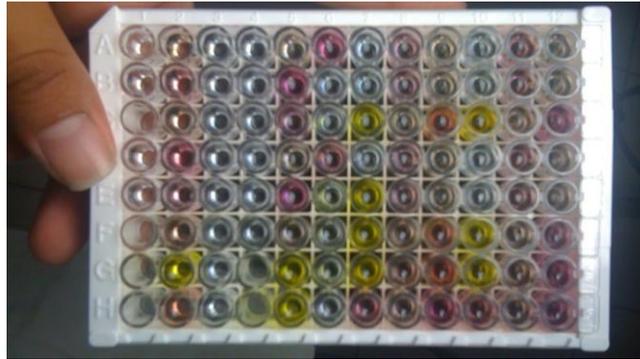


Figura 5. Placa de reacción de bioquímica clínica del equipo ChemWell® 2910.

Análisis microbiológico

En el análisis microbiológico de las muestras en 6 de los 21 pacientes (28.6 %) se aislaron como cepas únicas, escasas unidades formadoras de colonias de *Staphylococcus epidermidis*, microbiota normal (Figura 6).

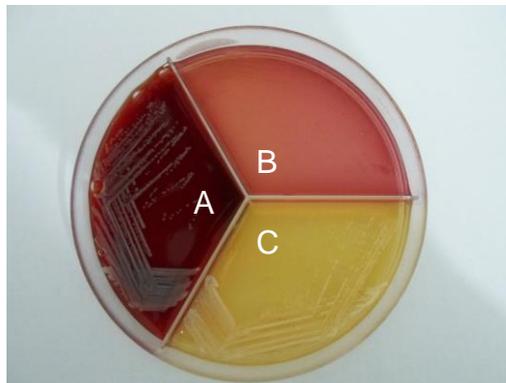


Figura 6. Cultivo microbiológico de lesión, caja de Petri con tres divisiones, A) Agar Gelosa Sangre conteniendo colonias de *Staphylococcus epidermidis*, B) Agar MacConkey sin crecimiento bacteriano y C) Agar Sabouraud con crecimiento de *Staphylococcus epidermidis*.

Análisis citológico

Se apreció la presencia de células ovoides de origen mesenquimatoso con citoplasma pálido eosinofílico vacuolado, núcleo redondo hiper cromático con uno o dos nucléolos conspicuos. Así mismo, se observaron algunas figuras mitóticas atípicas y la relación núcleo citoplasma fue de 4:1, Citología sugerente de Tumor Venéreo Transmisible (Figura 7 y 8).

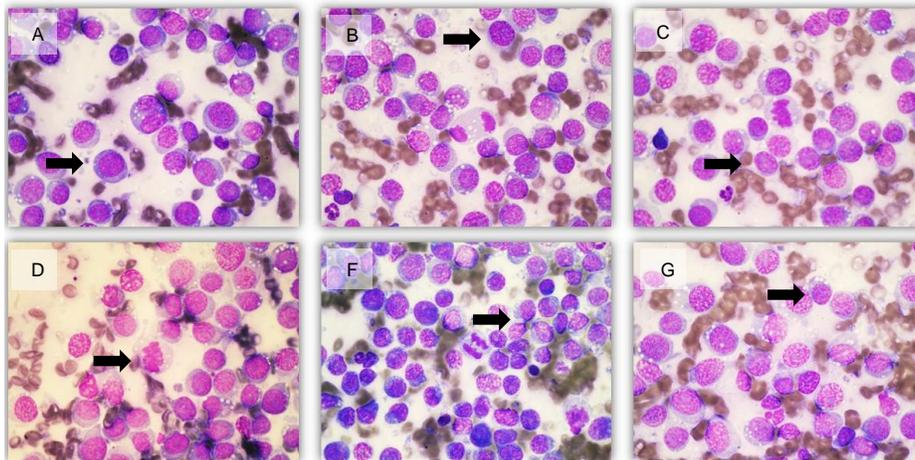


Figura 7. Fotomicrografías de improntas A, B y C: se observan células de aspecto linfocitoide (flecha), D: mitosis atípica (flecha), E y G: célula de aspecto plasmocitoide (flecha) características del Tumor Venéreo Transmisible. Técnica de Wright 100x.

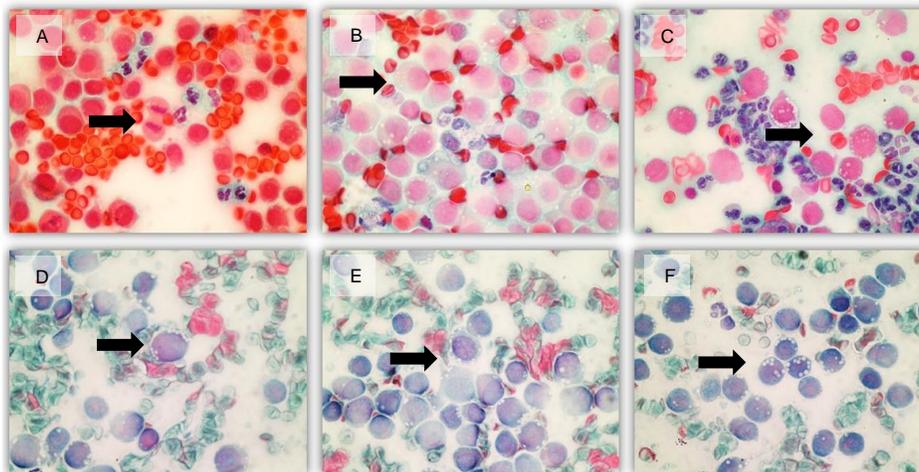


Figura 8. Fotomicrografías de improntas A: Célula en mitosis (flecha), B: Célula de aspecto plasmocitoide (flecha), C, D y F: se aprecian células con el citoplasma vacuolado (flecha), Técnica de Papanicolaou, 100x.

Análisis histopatológico

En cortes histológicos realizados en bloques de parafina, cortados a 4 micras y teñidos con hematoxilina y eosina se observó: lesión neoplásica conformada por células que se disponen en mantos y de manera dispersa, las cuales tienen citoplasma eosinófilo escaso mal definido y núcleos ovales con cromatina granular fina y nucléolos prominentes, identificando numerosas mitosis atípicas de manera dispersa. El estroma es laxo y hay vasos congestivos con células neoplásicas en su pared (Figura 9).

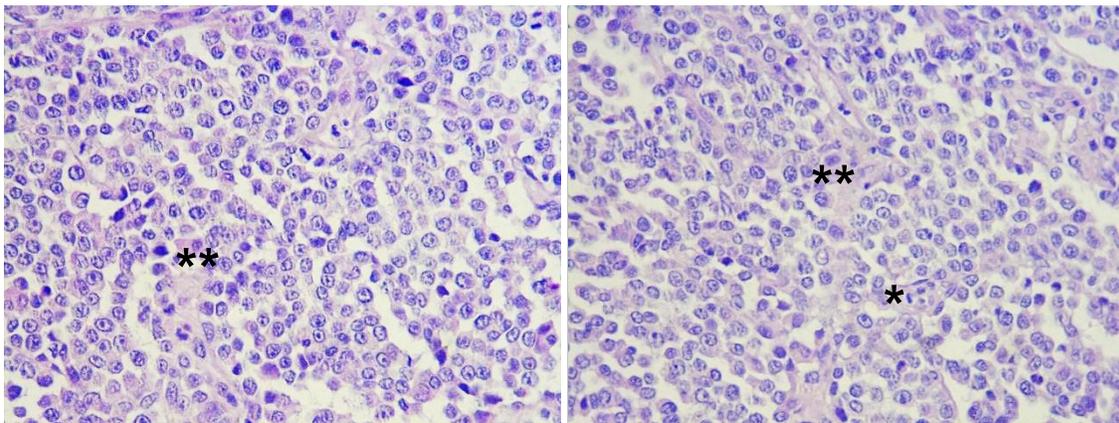


Figura 9. Corte histológico de biopsias, donde se observa tejido tumoral integrado por células que se disponen en mantos y de manera dispersa, las cuales tienen citoplasma eosinófilo escaso, mal definido y núcleos ovales con cromatina granular fina y nucléolos prominentes, identificando mitosis atípicas de manera dispersa (*). El estroma es laxo (**) y hay vasos congestivos con células neoplásicas en su pared.

Análisis molecular

Para confirmar que se haya extraído DNA de calidad analítica se realizó una PCR para el gen de la β -globina (GH20 y PC04, 285 pb) y la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa específica de caninos (dogGAPDHf y dogGAPDHR, 585 pb). 16 de 21 muestras (76 %) amplificaron para el gen de la β -globina y 20 de 21 (95 %) para el gen de la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Figura 10 y 11, respectivamente).

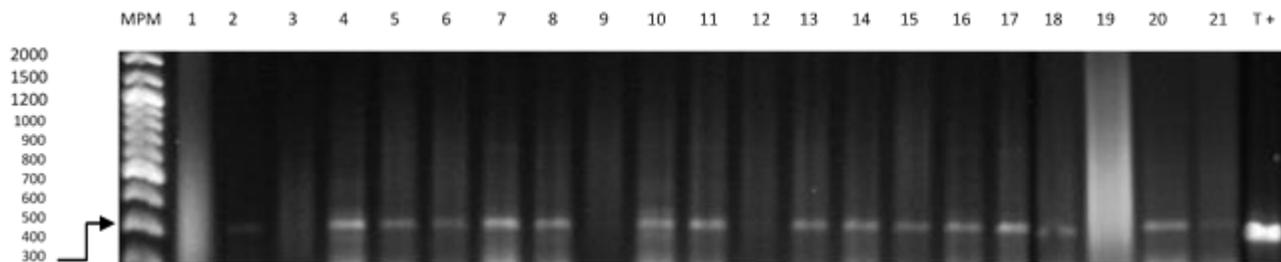


Figura 10. Amplificación del gen de la β -globina a partir de DNA genómico obtenido de biopsias de Tumor Venéreo Transmisible: MPM (Marcador de peso molecular, GeneRuler), carril del 1 al 21: muestras de biopsias, T- (Testigo negativo) y T+ (Testigo positivo). En las muestras 2, 4-8, 10, 11, 13-18, 20 y 21, se observa una banda correspondiente al amplicón de la β – globina de 268 pb, coincidiendo con los productos esperados.

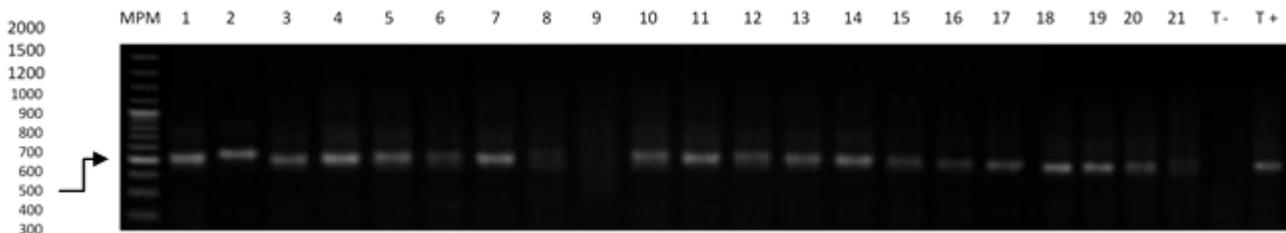


Figura 11. Amplificación del gen de la enzima Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa a partir de DNA genómico obtenido de biopsias de Tumor Venéreo Transmisible. MPM (Marcador de peso molecular, GeneRuler), carril del 1 al 21: muestras de biopsias, T- (Testigo negativo) y T+ (Testigo positivo). En las muestras 1-8 y 10-21 se observa una banda correspondiente al amplicón del gen de la enzima Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa de 586 pb, coincidiendo con los productos esperados.

Los resultados de PCR para la amplificación de L1 con los iniciadores MY09 y MY11 demostraron la presencia de una banda de 450 pb en siete muestras de 21 (33 %) (Figura 12).

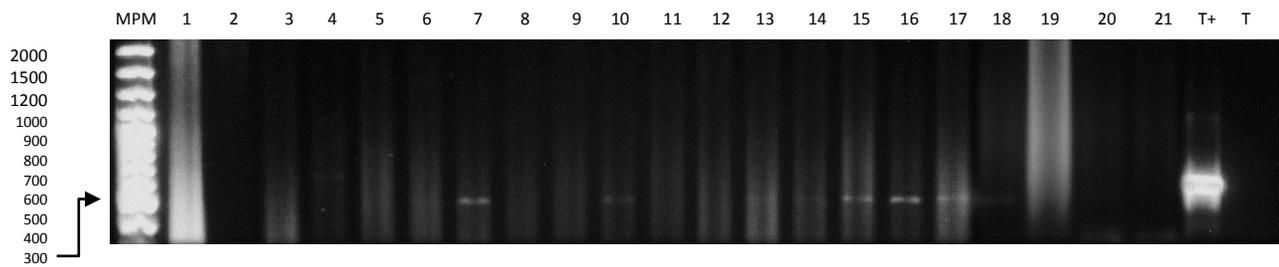


Figura 12. Amplificación del gen L1 de Papilomavirus con los iniciadores MY09 y MY11 a partir de DNA genómico obtenido de biopsias de Tumor Venéreo Transmisible. MPM (Marcador de peso molecular, GeneRuler), carril del 1 al 21: muestras de biopsias, T+ (Testigo positivo) y T- (Testigo negativo). En las muestras 7, 10, 13 y 14-17 se observa una banda correspondiente al amplicón del gen L1 de Papilomavirus de 450 pb, coincidiendo con el producto.

Las muestras que amplificaron y sus productos se enviaron al servicio de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) para obtener la secuencia completa del amplicón, de las siete muestras enviadas seis resultaron positivas a Papilomavirus. Por otra parte, los resultados de PCR obtenidos con los iniciadores PVF y FAP-64 mostraron una positividad en 16 de 21 muestras (76 %) (Figura 13). Mientras que en la PCR para el gen E1 (CP4 y CP5) no se observó amplificación en ninguna de las muestras analizadas (Figura 14).

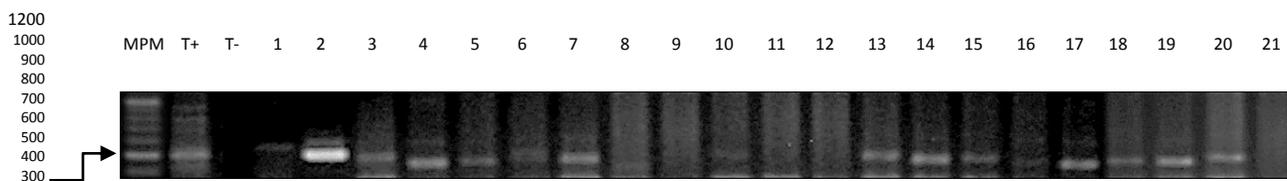


Figura 13. Amplificación del gen L1 de Papilomavirus Canino con los iniciadores PVF/FAP-64 a partir de DNA genómico obtenido de biopsias de Tumor Venéreo Transmisible. MPM (Marcador de peso molecular, GeneRuler), T+ (Testigo positivo) y T- (Testigo negativo), carril del 1 al 21: muestras de biopsias.

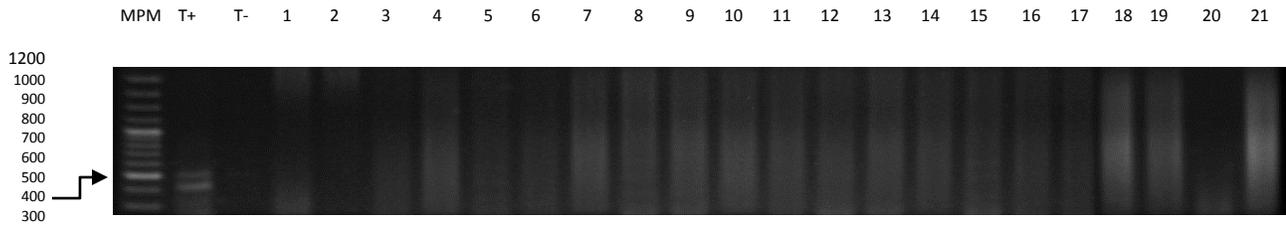


Figura 14. Amplificación del gen E1 de Papilomavirus Canino con los iniciadores CP4 y CP5 a partir de DNA genómico obtenido de biopsias de sarcoma de Stiker. MPM (Marcador de peso molecular, GeneRuler), T+ (Testigo positivo) y T- (Testigo negativo), carril del 1 al 21: muestras de biopsias. Sólo se observa una banda correspondiente al amplicón del gen E1 de Papilomavirus canino de 500 pb, en el testigo positivo coincidiendo con el producto esperado.

DISCUSIÓN

Con la finalidad de conocer la asociación existente entre Papilomavirus canino y el Tumor Venéreo Transmisible se realizó el análisis de las biopsias obtenidas de los pacientes que se presentaron en el servicio de Oncología Clínica de la Asociación Civil Esteriliza y Educa A.C., se incluyeron 21 pacientes. El 100% de los pacientes diagnosticados clínicamente con Tumor Venéreo Transmisible fueron positivos por citología e histopatología de acuerdo a lo reportado por Calero *et al.* (2006), quienes en su estudio obtuvieron un 100% de pacientes positivos a Tumor Venéreo Transmisible por histopatología.

Cabe mencionar, que se han reportado prevalencias mayores en hembras que en machos, como es el caso del estudio realizado por Ortega-Pacheco *et al.* en (2003), en Mérida, Yucatán, Méx., dichos reportes se relacionan con lo obtenido en el presente estudio, donde se observó una mayor proporción en hembras (77%) con Tumor Venéreo Transmisible en comparación con los machos (33%), debido quizá a que en las hembras la neoplasia se presenta inicialmente en el vestíbulo de la vagina y es más evidente que en los machos, ya que en sus formas iniciales en los machos solo puede apreciarse al momento en que desenvaina el pene para la copula y es cuando los propietarios perciben la presencia de una masa de nueva formación y acuden a consulta.

Por otro lado, Gonzales *et al.* (1997), realizaron un análisis retrospectivo de seis años en 2062 biopsias, de las cuales 117 (5.6 %) correspondieron a neoplasias en aparato reproductor. Este estudio localizó 48 neoplasias en vagina (41.02 %), 40 en vulva (34.18 %), 18 en ovario (15.38 %) y 11 en útero (9.40 %); de acuerdo con el tipo histológico, las neoplasias más frecuentes fueron: 8 casos de tumor de células de la granulosa (44.4 %) en ovario, 5 casos de adenoma (45.5 %) en útero, 31 (64.6 %) y 22 (55 %) casos de Tumor Venéreo Transmisible en vagina y vulva, respectivamente. De igual modo Mendoza *et al.* (2010) analizaron la casuística del Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú (periodo 1998 – 2004), en el cual encontraron una frecuencia de TVT de 8.4% (78/925), no existiendo predisposición de sexo.

A su vez, Bravo *et al.* (2010) en la Clínica Veterinaria de la Universidad de los Llanos, Colombia, realizó un análisis de prevalencias de 2004 a 2007 y analizó 93 casos en los cuales 68 correspondieron a neoplasias cutáneas (60.2%), seguido de 13 casos de glándula mamaria (11.5%). Las neoplasias de mayor incidencia fueron carcinoma escamocelular (15 casos), tricoepitelioma (11 casos) y mastocitoma canino III (10 casos). Los estudios anteriores, en conjunto, suponen que el Tumor Venéreo Transmisibile, tiene una alta prevalencia e incidencia en la población canina.

En lo que se refiere a metástasis, en el presente estudio no se observó metástasis en el 100 % de los pacientes a diferencia de lo reportado por Calero *et al.* (2006), quienes en su trabajo realizado en la provincia de Sancti Spíritus, Cuba, con un total de 14 perros de ambos sexos y razas diferentes, encontraron un que 14.28 % de los pacientes estudiados mostraron la presencia de metástasis extragenital en periné y ganglios inguinales. Esto puede deberse a que también se transmite por el olfateo y el lamido que permiten la implantación de las células tumorales en zonas extragenitales como en las mucosas nasal, oral y ocular, en piel, en periné y escroto. En particular las metástasis localizadas en pulmones, vísceras abdominales y en el sistema nervioso central no son frecuentes (Ojeda *et al.* 2016).

Con respecto a los síndromes paraneoplásicos, no se observaron cambios en el hemograma ni en la bioquímica clínica en el día cero, ya que todos los pacientes se encontraron dentro de los intervalos biológicos de referencia para la especie, al examen físico general en los pacientes se observó una temperatura corporal, frecuencia respiratoria y cardíaca dentro de intervalos de normalidad. Así mismo se presentaron con un estado corporal bueno (de 3–4, en la escala de 1 a 5), lo cual coincide con lo que reporta, en el día cero, De la Cruz *et al.* (2015) y Cizmeci *et al.* (2012).

Así mismo, Calero *et al.* (2006) en su investigación analizó muestras de sangre en el día cero para determinar hemoglobina y hematocrito, donde encontraron que los pacientes presentaban anemia atribuyendolo al hecho de que

los tumores, de los pacientes en estudio, estaban ulcerados y sangrantes resultados que coincide con lo reportado por Carvajal *et al* (2016); además cabe mencionar que los pacientes analizados en el presente estudio no presentaban ulceraciones significativas resultado que coincide con los encontrado por De la Cruz *et al* (2015) en el día cero. De igual forma, no se aislaron bacterias patógenas de las masas tumorales incluidas en este estudio, debido en gran medida a que los propietarios de los pacientes incluidos en el estudio tuvieron buenas prácticas higiénicas.

Con respecto al análisis molecular de las biopsias de Tumor Venéreo Transmisible, la calidad de las muestras empleadas se pudo verificar mediante la amplificación del gen de la β -globina, obteniendo un total de 76% de muestras positivas, mientras que la amplificación del gen GAPDH se obtuvo un total de 95% de muestras positivas (Figura 5 y 6, respectivamente). Debido a que las muestras fueron de calidad analítica se decidió incluir el 100 % de ellas en el estudio, las cuales se emplearon para la amplificación de los genes L1 y E1 en la etapa subsecuente del proyecto, basados en las condiciones reportadas por Gravitt *et al.* (2000), Jafari *et al.* (2013) y Lange *et al.* (2011).

Los resultados de la amplificación del gen L1 empleando el par de iniciadores universales MY11 y MY09 demostraron la presencia de DNA viral en el 33% de las muestras, estos cebadores son ampliamente empleados en estudios moleculares de detección del Virus del Papiloma Humano (Gravitt *et al.* 2000) y se ha reportado su utilidad en la detección de virus en muestras animales, como es el caso del estudio realizado por Luff *et al.* (2012), en el cual identificó y tipificó al Papilomavirus Canino en placas pigmentadas cutáneas, de igual modo Anis *et al.* (2016) lograron la detección y tipificación de Papilomavirus canino en lesiones palmares de perros Greyhound.

Por otro lado al emplear el par de iniciadores PvF y FAP-64, que de igual forma están dirigidos a amplificar una región del gen L1 que codifica para la proteína mayor de la cápside, el porcentaje de positividad de las muestras analizadas aumento a un 76%; sin embargo, el par de iniciadores CP4 y CP5 no mostró positividad para ninguna de las muestras analizadas, este último par de iniciadores

está diseñado para amplificar una región del gen E1, el cual presenta una variación entre los papilomavirus lo cual podría explicar la ausencia de amplificación en las muestras analizadas. Lo anterior resulta interesante desde el momento en que los iniciadores PVF y FPA-64 han sido empleados para la amplificación de secuencias de Papilomavirus caninos en un estudio llevado a cabo por Lange *et al.* (2011), en el cual utilizó diferentes cebadores para identificar papilomavirus canino en muestras de piel.

De igual forma es importante señalar que de los papilomavirus caninos estudiados, se han reportado los genomas de nueve papilomavirus caninos los cuales han sido asignados a tres géneros: Lambda (CPV 1 y 6), Tau (CPV 2 y 7) y Chi (CPV 3, 4, 5, 8 y 9) basados en la secuencias de nucleótidos del gen L1 (Lange *et al.* 2013) y que a la fecha no se ha reportado un método específico de detección, siendo el estudio de Lange *et al.* (2013) el único que ha reportado condiciones de PCR que son capaces de detectar cinco tipos de papilomavirus canino para el caso de los iniciadores PVF y FPA-64.

Los resultados en el presente estudio coinciden con el análisis de Lange *et al.* (2013) y permite sugerir que el virus esté implicado en el proceso oncogénico del Tumor Venéreo Transmisible, puesto que 17.8% de todos los casos de cáncer en humanos son debidos a agentes infecciosos, los cuales incluyen virus (12.1 %), bacterias (5.6 %) y helmintos (0.1 %), con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo (Álvarez *et al.* 2015).

Así mismo, se han descrito como agentes biológicos carcinogénicos siete virus con capacidad de inducir la transformación celular, ya sea de forma indirecta por inflamación crónica como resultado de una continua respuesta inmune a una infección persistente como ocurre con los virus de la hepatitis B y C o por acción directa de sus proteínas oncogénicas como es el caso del Virus del Papiloma Humano (VPH). A su vez, un ejemplo de mecanismo indirecto por supresión crónica del sistema inmune ocurre en el caso del virus de la inmunodeficiencia huma (VIH), por lo que un sistema inmune comprometido puede resultar en un incremento en la incidencia de tumores, como ha sido observado en individuos VIH positivos o en

pacientes trasplantados que son tratados con inmunosupresores (Álvarez *et al.* 2015).

Cabe señalar que la persistencia del genoma viral sin replicación, de forma latente, es de vital importancia para la carcinogénesis, como es el caso de la infección por el virus de Epstein Barr (VEB) que ha sido relacionada con varias entidades linfoproliferativas como el linfoma de Burkitt, el linfoma T/NK extranodal, el linfoma/Leucemia NK agresivo, la granulomatosis linfomatoide, el linfoma angioinmunoblástico de células T, el linfoma de Hodgkin y el linfoma de células T (Beltrán *et al.* 2008); entonces, se sugiere que este mecanismo puede ocurrir en los pacientes con Tumor Venéreo Transmisible. De manera similar, los virus que a través de la integración del genoma viral al genoma de la célula hospedadora, como es el caso del Papilomavirus, provocan la transformación de la misma (De la Fuente-Villareal *et al.* 2010).

Es necesario recalcar que este proceso de transformación ocurre por la presencia de proteínas virales que promueven el crecimiento celular y la supervivencia de la célula al intervenir en el ciclo celular (De la Fuente-Villareal *et al.* 2010, Álvarez *et al.* 2015). Un ejemplo de lo anterior es el cáncer cervical en humanos, el cual es un problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en países con economías emergentes y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en mujeres, en la cual se ha detectado la presencia de DNA de Virus del Papiloma Humano en casi un 100% (García *et al.* 2010). Conviene recalcar que los papilomavirus pertenecen al grupo de los virus con tropismo por los epitelios; infectan predominantemente la piel y las membranas mucosas y producen proliferaciones benignas o papilomas, que bajo ciertas circunstancias pueden experimentar proliferación maligna (De la Fuente-Villareal *et al.* 2010).

Retomando el trabajo realizado por Kennedy *et al.* (1977), en el cual para evidenciar si existe la presencia de algún virus en las células del tumor, inoculó en cachorros y en perros adultos el tumor, y tras un periodo de incubación realizó la técnica de microscopía electrónica de transmisión y observó la presencia de partículas similares a virus en las muestras obtenidas de los cachorros, mientras

que en las muestras obtenidas de los adultos no se observaron dichas partículas, este hecho puede deberse a que en los perros adultos el virus se encuentra en un estado episomal, situación que puede influir si existiera variación en la edad de los pacientes.

El análisis citológico de células infectadas por Papilomavirus incluye acantosis, vacuolización citoplásmica prominente, atipia nuclear y binucleación. En la infección de tipo latente, la infección ocurre predominantemente en células inmaduras (células basales o células metaplásicas) del epitelio escamoso. El DNA viral permanece dentro de la célula en forma circular libre (forma episomal) sin replicarse y no hay cambios morfológicos identificables en la citología, por lo que la detección viral en este tipo de infecciones solo puede hacerse por métodos moleculares (De la Fuente-Villareal *et al.* 2010). Es muy probable que debido a ello Kennedy y cols. (1977) No hayan encontrado estructuras virales en la muestras analizadas, dado que en los pacientes adultos el virus se encontrara de forma latente o episomal y que en esa época aún no se contaba con una herramienta como la PCR para la detección de virus, no pudo concluir si dichas estructuras pertenecían a un virus y que es lo que pasaba con los pacientes adultos.

CONCLUSION

Se realizó la evaluación de las muestras obtenidas de los pacientes diagnosticados clínicamente con Tumor Venéreo Transmisible por citología e histopatología, con lo cual, se confirmó el diagnóstico. Así como la evaluación de los pacientes mediante un hemograma y bioquímica clínica, en los cuales los pacientes no mostraron alteración alguna. Por otra parte, de las muestras para microbiología solo se obtuvieron como aislados cepas pertenecientes a la microbiota normal.

Los resultados obtenidos evidencian la presencia de DNA del CPV en las biopsias analizadas, las muestras secuenciadas demostraron la identidad de los amplicones, coincidiendo en uno de los grupos con el Virus del Papiloma Humano. De ahí que la detección de secuencias virales, sustenta la posible asociación entre el CPV y el Tumor Venéreo Transmisible; sin embargo, se hacen necesarios mayores estudios para demostrar la etiología de esta enfermedad. Este estudio representa un precedente importante en el entendimiento y estudio del agente causal del tumor.

PERSPECTIVAS

Es necesario realizar estudios de efecto citopático, identificación y tipificación de CPV en muestras clínicas de Tumor Venéreo Transmisible. Así como generar análisis citológicos que permitan la comprensión de la interacción entre el virus y la célula hospedadora. De igual forma es necesario investigar el mecanismo oncogénico del CPV en un modelo *In vitro* para demostrar la causalidad de la enfermedad y así documentar la relación entre el virus y el tumor.

REFERENCIAS

- Anis, E. A., Frank, L. A., Francisco, R. & Kania, S. A. 2016. Identification of canine papillomavirus by PCR in Greyhound dogs. *PeerJ*. 4: e2744.
- Barba, E. J. R. 2013. Laboratorio clínico y oncología: de los aspectos básicos del cáncer a los tumores más frecuentes y la utilidad de los marcadores tumorales como métodos diagnósticos. *Patol Clín Med Lab* 60 (3): 166-196.
- Beltran Garate, B., Morales Luna, D., Quiñones Ávila, P., Hurtado de Mendoza Acurio, F., Cotrina Montenegro, E. & Riva Gonzáles, L. 2008. Desorden linfoproliferativo de células B asociado al virus Epstein Barr y relacionado a la edad: reporte de 9 casos y revisión de la literatura. *Acta Méd Peruana*. 25: (1) 42-45.
- Benavides-Melo, C. J., Delgado-Arellano, L. A. & Mideros, C. 2012. Valoración de la involución Neoplásica del tumor venéreo transmisible, aplicando vincristina por vía subcutánea e intravenosa. *Rev Inv Pec* 1 (2): 74
- Bentosela, M. & Mustaca A. E. 2007. Comunicación entre perros domésticos (*Canis familiaris*) y hombres. *Revista Latinoamericana de Psicología* 39 (2): 375-387.
- Bernard, H. U., Burk, R. B., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H. & de Villiers, E. M. 2010. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. *Virology* 401 (1): 70-79.
- Biller, B. 2014. Metronomic chemotherapy in veterinary patients with cancer. *Vet Clin Small Anim* 44: 817–829.
- Bojrab, M. J., Smeak, D. D., & Bloomberg, M. S. 1996. Fisiopatología y clínica quirúrgica en animales pequeños. *Inter-Médica*.
- Bonfanti, U., Bertazzolo, W., Gracis, M., Roccabianca, P., Romanelli, G., Palermo, G., & Zini, E. 2015. Diagnostic value of cytological analysis of tumours and

- tumour-like lesions of the oral cavity in dogs and cats: A prospective study on 114 cases. *The Veterinary Journal*. (2): 322-327.
- Boston, S. & Henderson, R. A. 2014. Role of surgery in multimodal cancer therapy for small animals. *Vet Clin Small Anim*. 44: 855 – 870.
- Bravo, T. D., Cruz-Casallas, P. & Ochoa, A. J. 2010. Prevalencia de neoplasias en caninos en la universidad de los Llanos, durante 2004 a 2007. *Rev. MVZ Córdoba* 15 (1):1925-1937.
- Calero, H. I., Eustace, T. R. J. C. & Rodríguez, F. 2006. Comprobación de la efectividad de os esquemas terapéuticos en el tratamiento del Tumor de Sticker en perros. *Red Vet*. 8 (10): 1 -7.
- Calvo, B., Calvo, F. A., Zapatero, A., de la Torre, A. Porto, C., Fernández, C. & Biete, A. 2004. Radioterapia y cáncer. *Oncología* 27 (6): 384-387.
- Campbell, T. W. 2015. Evaluation of the blood film. *Vet Clin Exot Anim* 18: 117–135.
- Carter, G.R. & Wise, D.J. Herpesviridae. In: Carter G.R. and Wise D.J. A Concise Review of Veterinary Virology. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), 2006; Document No. A3411.0506.ES.
- Carvajal, J. S., Bonilla, A. F. & Rondón-Barragán, I. S. 2012. Carcinoma de células escamosas con metástasis pulmonar en un equino criollo colombiano: reporte de caso. *Rev CES Med Vet y Zoo*. 7 (2): 56 – 53.
- Carvajal, S. D. A., García, C. A. R., Maltes, S. J. M., Ortiz, F. D. A. & Valencia, H. A. F. 2016. Efecto del sulfato de vincristina sobre las células hematológicas en un paciente con tumor venéreo transmisible (TVT). *Red Vet*. 17 (4): 1 -13.
- Cervera, B. A. 2005. Cáncer, panorámica general, aspectos básicos de la epidemiología, etiología, genética y diagnóstico. *Revista Pediátrica de Atención Primaria* 7 (27): 423-439.

- Cizmecci, S. U., Kose, A. M., Aydin, I., Dinc, D. A., Maden, M., & Kose, S. I. (2012). Clinical efficiency of Doxorubicin and Cisplatin in treatment of transmissible venereal tumor of bitches. *Revue Méd. Vét*, 163(11), 516-521.
- Correa, R. M. & Picconi, M. A. 2009. Virus Papiloma Humano (HPV) Parte I - Virología y carcinogénesis cutánea. *Edu Méd Cont*. 15 (6): 18 -23.
- Cowell, R. L. & Valencia, A. C. 2014. Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat. 4a ed. Elsevier. 582 pp.
- Cruz-Reyes, A. 2009. Fauna Feral, fauna nociva y zoonosis. Biodiversidad, México, 461 pp.
- De Alcântara, B. K., Alfieri, A. A., Rodrigues, W. B., Otonel, R. A. A., Lunardi, M., Headley, S. A. & Alfieri, A. F. 2014. Identification of canine papillomavirus type 1 (CPV1) DNA in dogs with cutaneous papillomatosis. *Pesq. Vet. Bras*. 34 (12): 1221-1224.
- De Buen, N., Candanosa, A. E. & Castillo, A. G. 1988. Diagnostico citológico en veterinaria: Análisis de 3563 casos. *Vet Méx* 19: 215-221.
- De la Cruz, S. M., Quijano-Hernández, I. A., Del Ángel-Caraza, J., Martínez, C. J. S., Victoria-Mora, J. M. & Barbosa-Mireles, M. A. 2015. Respuesta del tumor venéreo trasmisible canino a presentaciones de vincristina de patente y genérica. *Rev Inv Vet Per* 26 (4): 587-595.
- De la Fuente-Villareal, D., Guzmán-López, S., Barboza-Quintana, O. & González-Ramírez, R. 2010. Biología del virus del papiloma humano y técnicas de diagnóstico. *Medicina Universitaria*. 12 (49): 231 – 238.
- Dejucq, N. & Bernard, J. 2001. Viruses in the Mammalian Male Genital Tract and Their Effects on the Reproductive System. *Mic and Mol Bio Rev*. 66 (2): 208 – 231.
- Díaz, R. T. M., Faxe, G. M. E. & Arango, P. M. C. 1998. Factores etiopatogénicos en la génesis del cáncer. *Rev Cub Onc* 14 (1): 42-50.

- Fan, T. 2014. Pain Management in veterinary patients with cancer. *Vet Clin Small Anim.* 44: 989–1001.
- Ferrís, T. J., Ortega, G. J. A. & López-Ibor, A. B. 2004. La etiología y la prevención del cáncer pediátrico. *An Pediatr* 61 (1): 1-4.
- Flores, C. R. 2010. La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. *Gac Méd de Méx.* 146: 423 – 429.
- Fouéré, S., Biver-Dalle, C., Prétet, J. L., Mougín, C. & Aubin, F. 2016. Lesiones cutáneas y mucosas asociadas al virus del papiloma humano. *EMC – Dermatología.* 50 (1): 1 – 12.
- Franco, L. F. & Silva-Molano, R. F. 2009. Frecuencia de presentación de la casuística atendida en el área de clínica quirúrgica del Hospital Veterinario de la Universidad de Caldas (2002-2004). *vet zoot* 3 (2): 51-55.
- Fuentes-Pananá, E., Camorlinga-Ponce, M. & Maldonado-Bernal, C. Infección, Inflamación y cáncer gástrico. *Salud Pública de México* 51 (5): 427-423.
- García, D. A., Schmitt, M., Cid-Arregui, Á., Castillo, M., Briceño, I. & Aristizábal, F. A. 2010. Genotipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras de cepillados cervicales de pacientes de diferentes hospitales de Bogotá y evaluación de la concordancia de dos métodos basados en PCR. *Rev Colom de Obst y Gine.* 61 (4): 310-318.
- García-Conde, J. & Díaz-Rubio, E. 2000. *Oncología clínica básica.* Arán Ediciones, España, 754 pp.
- González, C. G., Sánchez, B. C. A., Vélez, H. M. E. & de Buen, de A. N. 1997. Neoplasias en aparato reproductor en perras: estudio retrospectivo de 6 años. *Vet Méx* 28 (1): 31-34.
- González, C., Cepeda, R., Flores, E., Cattaneo, G. & Colarte, K. 2002. Separación y purificación de células del tumor venéreo transmisible canino espontáneo,

en gradiente de densidad de polisucrosa y diatrizoato de sodio. *Ava en Cien Vet.* 17: 18 – 23.

González, C., Cepeda, R., Flores, E., Cattaneo, G. & Reyes, S. 2003. Apoptosis en tumos venéreo trasmisible del canino en fase de crecimiento progresivo y durante regresión inducida por vincristina. *Ava en Cien Vet* 18 (2): 54-62.

Gravitt, P. E., Peyton, C. L., Alessi, T. Q., Wheeler, C. M. Coutlée, F., Hildesheim, A., Schiffman, M. H., Scott, D. R. & Apple, R. J. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Jou of Clin Micro.* 38 (1): 357 – 361.

Gross, T. L., Ihrke, P. J., Walder, E. J. & Affolter, V. K. 2005. *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis.* 2^a ed., Blackwell Science, USA, 944 pp.

Hooker, B. A. & Blomme, E. A. 2015. Targeted drug delivery in oncology: Where drug discovery meets physics. *The Veterinary Journal.* 2: 120-121.

Jafari, H., Gharemonhammadlou, R., Fakhrijou, A., Ebrahimi, A., Nejati-Koshki, K., Nadri, M. & Sakhinia, E. 2013. Genotyping of human papillomavirus and TP53 mutaions at exons 5 to 7 in lung cancer patients from Iran. *BiolImpacts.* 3 (3): 135-140.

Kadosawa, T. & Watabe, A. 2015. The effects of surgery-induced immunosuppression and angiogénesis on tumour growth. *The Veterinary Journal.* 205: 175–179.

Kamstock, D. A., Ehrhart, E. J., Getzy, D. M., Bacon, N. J., Rassnick, K. M., Moroff, S. D., Liu, S. M., Straw, R. C., McKnight, C. A., Amorim, R. L., Bienzle, D., Cassali, G. D., Cullen, J. M., Dennis, M. M., Esplin, D. G., Foster, R. A., Goldschmidt, M. H., Gruber, A. D., Hellmén, E., W. Howerth, E., Labelle, P., Lenz, S. D., Lipscomb, T. P., Locke, E., McGill, L. D., Miller, M. A., Mouser, P. J., O'Toole, D., Pool, R. R., Powers, B. E., Ramos-Vara, J. A., Roccabianca, P., Ross, A. D., Sailasuta, A., Sarli, G., Scase, T. J., Schulman, F. Y., Shoieb, A. M., Singh, K., Sledge, D., Smedley, R. C. K.,

- Smith, C., Spangler, W. L., Steficek, B., Stromberg, P. C., Valli, V. E., Yager, J. & Kiupel, M. 2011. Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimens in veterinary surgical pathology. *Veterinary Pathology* 48(1): 19 – 30.
- Kennedy, J. R., Yang, T. J. & Allen, P. L. 1977. Canine transmissible venereal sarcoma: electron microscopic changes with time after transplantation. *Br J Cancer* 36: 375-385.
- Klahn, Sh. 2014. Chemotherapy safety in clinical veterinary oncology. *Vet Clin Small Anim* 44: 941–963.
- Lange, Ch. E., Zollinger, S., Tobler, K, Ackermann, M. & Favrot. 2011. Clinically healthy skin of dogs is a potential reservoir for canine papillomavirus. *Jou of Clin Micro.* 49 (2): 707 – 709.
- Lelo, L. G. Z., Martín, M. F., Sosa, F. C. F., Avila, M. J., Lloret, R. M., Román, L. M. & Vega, M. G. 2012. Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano. *Rev Chil Obs Gin.* 77 (4): 315 – 321.
- Luff, J., Moore, P., Zhou, D., Wang, J., Usuda, &, Affolter, V., Schlegel, R. & Yuan, H. 2012. Complete genome sequence of Canine Papillomavirus Type 10. *Journal of Virology* 86 (20): 11407.
- Martínez-Barbabosa, I., Gutiérrez, C. E. M, Alpízar, S. E. A. & Pimienta, L. R. J. 2008. Contaminación parasitaria en heces de perros, recolectadas en calles de la ciudad de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México. *Vet. Méx.*, 39 (2): 173 – 180.
- Matz, B. M. 2015. Current concepts in oncologic surgery in small animals. *Vet Clin Small Anim* 45: 437– 449.
- Mendoza, V. N., Chavera, C. A., Falcón, P. N. & Perales, C. R. 2010. Frecuencia del tumor venéreo transmisible canino: caústica del laboratorio de patología

- veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Período 1998 - 2004). *Rev Inv Vet Perú*. 21 (1): 42-47.
- Mi-Sun P., Yongbaek, K., Min-Soo, K., Sang-Yeon, O., Doo-Youn C., Nam-Shik S. & Dae-Yong K. 2006. Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. *Jor Vet Diag Inv*. 18:130–133.
- Morales, S. E. & González, C. G. Frecuencia de tumor venéreo trasmisible en perros de la ciudad de México entre 1985 y 1993. *Rev Vet Méx* 26 (3): 73 -75.
- Novinsky, M. 1876. O privivanii trakovikh novoobrazovanii. *Med. Vestn*, 16: 289-290.
- Ojeda, J., Alfaro, A. Moroni, M., Camacho, V., Martínez, J. & Noro, M. 2016. Tumor venéreo transmisible diseminado sobre piel, párpados y pene en un perro. Reporte de caso. *Arch Med Vet* 48: 119-123.
- Ortega-Pacheco, A., Acevedo-Arcique, M., Sauri-Arceo, C., Bolio-González, M. & Gutiérrez-Blanco, E. 2003. Prevalencia de tumor venéreo trasmisible en perros en situación de calle de la ciudad de Mérida, Yucatán, México. *Rev. Biomed* 14 (2): 83-87.
- Ramírez, R. R., García, J. C. J. A., Navárez, G. A. M. & Rodríguez T. L. E. 2010. Tumor venéreo trasmisible con metástasis a un hemangioma esplénico en una perra. *VetMéx* 41(4): 305-310.
- Raposo, T. P., Beirão, B.C.B., Pang, L.Y., Queiroga, F.L. & Argyle, D.J. 2015. Inflammation and cancer: Till death tears them apart. *The Veterinary Journal*. 205: 161–174.
- Rautava, J. & Syrjanen, S. 2012. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head and Neck Pathol*. 6: S3–S15.
- Rector, A. & Van Ranst, M. 2013. Animal papillomaviruses. *Virology*. 445: 213 – 223.
- Redondo, R. B. F., Chacon, R. M., Grau, A. J. A. & Nicot, V. L. 1998. Evaluación de la sintomatología más frecuente en el paciente oncológico en fase terminal. *Rev Cubana Oncol* 14(2): 83 – 86.

- Remington, G. A. 2003. Remington Farmacia. 20ª edición. Tomo 2. Editorial Panamericana. Argentina. 2506 paginas.
- Senra, V. A. 2002. El cáncer: etiología, epidemiología, diagnóstico y prevención. Elsevier, España, 184 pp.
- Serrano-Altamirano, V., Silva-Serna, M. M., Cano-García, M. Á., Medina-García, G., & Ruíz-Corral, J. A. 2005. Estadísticas climatológicas básicas del estado de Oaxaca (período 1961-2003). INIFAP. SAGARPA. Libro técnico No. 4. Oaxaca, México, 272 pp.
- Siddle H.V. & Kaufman J. 2013. A tale of two tumours: comparison of the immune escape strategies of contagious cancers. *Mol. Immunol.* 55:190 – 193.
- Sierra, L. E. M., Bolio, G. M. E., Altamirano, M. M. de G., Cocom, P. E. A., Hiuit, C. A. H. & Antúnes, Ch. J. de J. 2011. Análisis de la presencia de perros “ferales” sobre la salud ambiental en la Reserva Ecológica “Cuxtal”, Mérida, Yucatán, México. 4 (1): 53-57.
- Sierra, L. E. M., Bolio, G. M. E., Altamirano, M. M. G., Cocom, P. E. A., Hiuit, C. R. A. & Antúnes Ch. J. J. 2011. Análisis de la presencia de perros “ferales” sobre la salud ambiental en la Reserva Ecológica “Cuxtal”, Mérida, Yucatán, México. *Bioagrobiencias* 4 (1): 53-57.
- Silva, R., León, D., Brebi, P., Ili, C., Roa, J. C. & Sánchez, R. 2013. Diagnóstico de la infección por virus papiloma humano en el hombre. *Rev Chil Infe.* 30 (2): 186-192.
- Vázquez, D. R., Escudero, D. C., Doménech, G. A., Gómez-Lucía, D. & Benítez, R. L. 2012. Papilomatosis bovina: Epidemiología y diversidad de Papilomavirus bovino (CPV).
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Díaz, L. A. & Kinzler, K. W. Cancer genome landscapes. *Science.* 339: 1546 - 1558.

APÉNDICE

Abreviaturas

BPV: Papilomavirus Bovino.

CD45: Cluster de diferenciación 45.

CD45RA: Cluster de diferenciación 45RA.

CPV: Papilomavirus canino.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

dsDNA: DNA de doble cadena.

HPV: Papilomavirus humano.

LCR: Región larga de control.

mRNA: RNA mensajero.

ORFs: Marcos abiertos de lectura.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PV: Papilomavirus.

RNA: Ácido ribonucleico.

TVT: Tumor Venéreo Transmisible.

URR: Región reguladora.

Secuencias de los productos positivos para Papilomavirus con los iniciadores MY09/MY11 en formato FASTA

Muestra 4 MY09

```
GGCGTTCCGTACATCATGAGCTGACTGCAGGAGCATTATCATGTAGCAGCAG
CTACGTACAGTGTATGACTGTGCATGAGCTACTGACTAAGGCCAGCTGCAG
ACTGGGCATACTATCGCTGCCAGAGCGAGTAGCAGATCGCGCACGATGACAG
GAA
```

Muestra 4 MY11

```
CGTAGATGCATGAGATAGATTATTGGTGTCTCATCTCCATGAGAATCGATGCT
CGTTTCCTGTCCTGCCGACCCCGTTGGTGTGGACGAGCAAACCATAAAAAA
CCCAACACGGCTTCCTATGGTGTGTCCATTATAATGTCCCTGTGCATGTGCAC
TCCCTTGCGTGTTCGACGCGCTCCTGGCCTAGCCCTAAGATCGGGAAGAA
TTATGTTAGAACGATTTTAATTACCCAATCAACATGGGTGTTAAGCGGTGTTTT
TATTTCAACATTTTTAACCCTGTTATGAACCCCTGAAAATATGCGCGTGT
```

Muestra 7 MY09

```
ATTTAGGCGTTTCGGTTTTGTTTCATTCTATATCTTGCAGGTCAGGGGATGACC
CCAGACCACATGTAGCCCAGGGACAGGAAAAATAGTCAGGTTGTGTTTCTGC
ATGAACATTGGATCCCCGATGACATAGTGTGGAACGCTCCACCATTGTTATGA
CCCTGTGCATCTTCTAAAATACTGTTATTCATACTATGAATATATGACAAAACAT
CTGCAGTTAAAGTTGTTGTACATATTGATATTTTTTTGCTATTTTTTTTTCCCT
GTCGG
```

Muestra 7 MY11

```
TATCGTGGTAGAACGAGTATCTGTCTCCCTACCCAGGCCAGTCTGCATACA
GTTGCGCTCTCTTGGCCTTTTTGTTGTGCGGGGCATCCCCTGTCTCTTCAGG
GGACAGGGGGAATGGCAGTCCTGGTAGCTCTTCTTCTGGATCAGTTTCCCCT
GGGACGATTAATAATTAGCCCCGGGATACTCTGACCCTGCTCCAAGGCAAGT
```

ATAATTTTGCCTTGGACTTATTTTTGCAATTATCAATAGTGTTTTGCTGTAGTTT
TATTTAACTTTTTTTCCCCTTTTTTAATCCCCGGAAAACCTGGCAAAGGAT
GCTGCGCCGGCTGAAAATAAGGATCCCTTTGATAAGTTATTTGTTTTGGAATA
GTGGATCTCAAGTGAAAAGTTTCCGTTAGACTTAAAATCAGTGTCCCCCTGGG
ACGAGAGAAGCATGG

Muestra 10 MY09

TTTTTGGGGTTTAGGTTTCTATCACATGTAGTCTCGTTCAATTCTTGCATAATTA
TGACCCTGGGCACCCAGGGACAGGAAAAATAGTCAGGTTGTGTTTCTGAATG
AACATTGGATCCCCGACGACAAAGTGTGGAACGCTCCACCATTGTTATGACC
CTGTGCA

Muestra 10 MY11

CCTCTCTGGGTGAGCCATAATTGATACACGGCGCCCAGTGAGCGACTGGGCC
GACACTTCCTGCCTCTCCGCTGTCTTGCCCTCGCTCGGTACCCAGGGCTGCC
CCCTCGCCCCCGTTATGATGACCCTGAAACCGCGACAGCTGCGAGAAAGA
TAACCTGCAGTCTGCCGTACACCGGAATGCCTACTTGTACAATGGAGTATG
GGTCCCCCGCCGGTACTAGTTTGGTGGAACTTATCGTTTTGTTGTTCCGGT
TGTTTTTATTGTCAAAGGAGGTTGCACCGGCGGATTATAAGTATGCCGAGGA
TAGTTAAAAGTTTTGGAATGCGGATTTAAAGGAATTGTCGTCTTGAACTTAGA
TCTGGTTGCCCTGGGCCGTGATTGACGACGTACTTTGGAGTTTTTTTATTAA
GAGGGGTCCGGTCTTTTGGCCGCGACGTGAGCACCGAAAAGGCCT

Muestra 14 MY09

GCATTAGTGATGAGACAGCATGACGTCAGCATCGACTAAGAGGTAGCTCATG
CTAGCGGCATGATGCTAGTTCGATGTACTTGATAACATGCACG

Muestra 14 MY11

CTCTCTTTGTAAGATCGCGGTCCATTTGTGAGACCCTTTTCAATTATCCTTATG
CTTGCCCTCCTTGAAGCCTGTGCCATTGTCATTCCCTGGTCAACTCCTTTGG
GATGCGGGATTATATGCCCTGCCTTCTTTTCGCTAAGTTAAGTTTCTGATGGG

ACGTTTATAGTTAAAAGAGCACATACACTTTAAAGTGCTCAGAGGCCAAACAAA
GCTGTGTATTGGATTTATATTGCCAATTATAAAAAGTTTAAAGCTGTAGTTACA
TTTTAACTTTTTTAACCCCCTATTATGTCCCTGTGCACAA

Muestra 15 MY09

TCCTTTTGGGGTTAGGTTTTCTCATTAAAGTCTTGGTTCATTCTTGGACCCTTA
TACCCCTGGGCACCGGGGACAGGAAAAAAGTGAGGTTGTGTTTCTGAATGA
ACATTGGATCCCCGATGACAAAGTGTGGAACGCTCCACCATTGTTATGACCCT
GTGCAG

Muestra 15 MY11

CACCCCAGTAGATCGGGTCTCTTTGTGCCCTTTTTCTACCCTTTTCAAGGT
GGTCTCCCTGGTTGGCCCTTTTTATTTCCCTGTCAACTGGTGGGCTTTCGGC
ATGGGGGACTCCAAATTTATCCGGCCCTAGCTCCGGAAGTCTTTTTCTTTTGT
TTCAATGGCAATGTCTGGCTGACACCATATCGGTATGTCCATGGGAAGTAGG
CCCCTTGTATTGTCCCTGTGCACATATCATAAGTGTTAAGCTGTAGTTTTATTT
TAACTTTTTTTTTCCCTTTTTTTTTCCCCCCTGAAAA

Muestra 16 MY09

TCTTTTGGGTATAATTTTCTCTTGTAATTTCCCTAATTCTTGGGAGTTTATGCCC
CTGCGACAAGGGGTAAGAGAGAGAGAGACCCTGGAAATAGAGGAATAT
GCCTTTTAAAAACGAAGGTGGGGTGGGGGTACTTAAAATTAGGACTCTGAAT
CAGCTAGTCATTTCCGATCTAGGACAAAATACCTGCAGAAAAAGAAAGGGTGA
CTACTGTAAAAATAGGGATTTTCGTATTCGTTGGATACCTGCTATACGGCTCG
AAGTCGCTAGCTTCCTATTGCCCTGTTTGGTTAGTGTATAAATCTCATAATGAT
CATTTGGTATTTTTATTTTTTTCTTTTATTTTTACTTTTATTGTTACTTTTCCCTCC
CCCTTGGTATCCTTTTGGTCAGTTGGAGTCTATATTTTCATTTTTTTGGTGAAT

Muestra 16 MY11

ATACGCAATTCTAGGACTTTAGATTTGTACATTACAACTTAATTCCATGGACA
GCTTAGCTAACTTCTTTTAGGAGTTAAGTCTCGTGCGCTTTTATCTTTGTAAT

GCGGTTCAATATGCTATACCTTCCTTGAGCTAAGTTACTATTCTGAAGCAAATT
TTAAAAATTAGCACCAGGATACTCTTAAAGTGCTCTCTGCCAAATATTATTTTG
CCCTGGTTTTATTTTGGCAATTATAAATAGTTTTTTGCTGTTTTTTTATTTAACT
TTTTTTTTTACCTTTTTTTTTCCCCCTGCACAAATGTCATTGGATGCTGCACCGG
TGAAAATAAGGATCCCTATGATAAGTTTAAATCTTGGAATGTGGATTTAAAGGA
AAAGTTTTCTTTAGACCTAGATCATCTTCCCTTGGGACGATTCTTTCCACTAT

Muestra 17 MY09

ACGTGGCGTTAATTTTTCTTGTCTATATTGAACAGCAAGGGATGTCCTCTC
ACCCTGGCAGCCCAGGGACAGTAAATATAGTCAGGTTGTGTTTCTGCATGAA
CATTGGATCCCCGATGACATAGTGTGGAACGCTCCACCATTGTTATGACCCTG
TGCAGAGTCTTGCGCCTTATATTCTTACTTTCCATTTACCTCTAAAAATCCTTT
TTAAAAATTAATTGTCTTTTTTTTTTTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATTGTTA
TTTTTATTGAAGGGAGGTTCTGTTTTCCCCC

Muestra 17 MY11

CATCCACGTAGAGAGGAACTGATCCTTTGTTATGACCCAAGTCCATAAATATTT
GGCTGTCCCTGGGCTACTTTTGGAGAGGGGTCATCACCTGTCTCTTCAGGGG
ACAGGGTGAATGGAAGTCCTGGTAGCTCTTCTTCTGGATCAGTTTCCCCTTGG
ACGATAAATAAATTATTCATAGCATTTTAATTTATTACATACATAACATCTTTGG
GGGGACCTTTATATTTACCCTTTCAA